

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 274

---

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique  
et Médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

---

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE  
DE L'ACTION  
DES RAYONS ULTRA-VIOLETS  
SUR LES PROTÉINES

---

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

*Le 6 Juillet 1938*

PAR

**WANG DIEN-SIANG**

Né le 27 Janvier 1913, à CHANGCHOW (Chine)



LYON

BOSC Frères M. & L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

42, Quai Gailleton, 42

1938



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE  
DES  
RAYONS ULTRA-VIOLETS SUR LES PROTEINES



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 274

---

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique  
et Médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

---

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE  
DE L'ACTION  
DES RAYONS ULTRA-VIOLETS  
SUR LES PROTÉINES

---

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

*Le 6 Juillet 1938*

PAR

WANG DIEN-SIANG

Né le 27 Janvier 1913, à CHANGCHOW (Chine)



LYON

BOSC Frères M. & L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

42, Quai Gailleton, 42

---

1938

## PERSONNEL DE LA FACULTE

|                       |                 |
|-----------------------|-----------------|
| Doyen honoraire ..... | M. L. HUGOUNENQ |
| Doyen .....           | M. J. LEPINE.   |
| Assesseur .....       | M. A. MOREL.    |

### PROFESSEURS HONORAIRES

MM. LANNOIS, HUGOUNENQ  
PIC, CONDAMIN, PAVIOT, NICOLAS, VILLARD, NOVE-JOSSERAND

### PROFESSEURS

|                                                           |   |                |
|-----------------------------------------------------------|---|----------------|
| Cliniques médicales .....                                 | } | MM. FROMENT    |
| Cliniques chirurgicales .....                             |   | SAVY.          |
| Clinique obstétricale et Accouchements .....              |   | TIXIER.        |
| Clinique ophtalmologique .....                            |   | BERARD.        |
| Cliniques dermatologiques et syphiligraphique .....       |   | VORON.         |
| Clinique neurologique et psychiatrique .....              |   | BOONNET.       |
| Clinique médicale infantile .....                         |   | FAVRE.         |
| Clinique gynécologique .....                              |   | LEPINE (J.J.)  |
| Clinique Oto-rhino-laryngologie .....                     |   | MOURIQUAND     |
| Clinique urologique .....                                 |   | PATEL.         |
| Clinique chirurgicale infantile et orthopédie .....       |   | COLLET.        |
| Clinique et prophylaxie de la tuberculose .....           |   | GAYET.         |
| Clinique des maladies infectieuses .....                  |   | TAVERNIER.     |
| Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie .....   |   | COURMONT       |
| Chimie biologique et médicale .....                       |   | J. CHALIER     |
| Chimie organique et Toxicologie .....                     |   | CLUZET.        |
| Matière médicale et Botanique .....                       |   | FLORENCE       |
| Parasitologie et Histoire naturelle médicale .....        |   | MOREL.         |
| Anatomie .....                                            |   | MANCEAU        |
| Histologie .....                                          |   | GUIART.        |
| Physiologie .....                                         |   | LATARJET       |
| Pathologie interne .....                                  |   | POLICARD.      |
| Pathologie générale et thérapeutique .....                |   | HERMANN        |
| Anatomie pathologique .....                               |   | X.             |
| Chirurgie opératoire .....                                |   | CADE.          |
| Médecine expérimentale et comparée et Bactériologie ..... |   | J.-F. MARTIN   |
| Médecine légale .....                                     |   | COTTE.         |
| Hygiène .....                                             |   | ARLOING (F.).  |
| Pharmacologie .....                                       |   | Etienne MARTIN |
| Hydrologie thérapeutique et Climatologie .....            |   | ROCHAIX.       |
|                                                           |   | LEULIER.       |
|                                                           |   | PIERY.         |

### PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

|                                                        |                     |
|--------------------------------------------------------|---------------------|
| Chargé d'un cours d'Anatomie médico-chirurgicale ..... | MM. THEVENOT (Léon) |
| Chargé d'un cours d'Embryologie .....                  | NOËL.               |

### AGREGES

|           |             |              |          |
|-----------|-------------|--------------|----------|
| MM.       | MM.         | MM.          | MM.      |
| GABRIELLE | GUILLEMINET | DE ROUGEMONT | MORIN    |
| DECHAUME  | MORENAS     | P. RAVAUULT  | BERTRAND |
| BERNHEIM  | REBATTU     | PIGEAUD      | CLAVEL   |
| POLLOSSON | REVOL       | PONTHUS      | LEVRAT   |
| CHAMPEON  | ENSELME     | CROIZAT      |          |
| CIBERT    | SEDALLIAN   | DELORE       |          |
| EPARVIER  | CREYSSEL    | JOSSERAND    |          |

### EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. FLORENCE, *président*; CLUZET, *assesseur*;  
ENSELME et REVOL.



*La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.*

A MES PARENTS

En témoignage d'une affectueuse  
et profonde reconnaissance.

A MON FRERE ET MA SŒUR

A MA FIANCEE

A MONSIEUR LE DOYEN J. LEPINE  
*Doyen de la Faculté de Médecine et de Pharmacie  
de Lyon*  
*Professeur de Clinique Neurologique et Psychiatrique*  
*Président de l'Association Franco-Chinoise*  
*Associé National de l'Académie de Médecine*  
*Membre de l'Institut*  
*Officier de la Légion d'Honneur*

En témoignage de respectueuse  
reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. FLORENCE  
*Professeur de Chimie Biologique et Médicale*  
*Chevalier de la Légion d'Honneur*

Nous dédions ce travail, qui est le fruit de ses bienveillants conseils et de ses encouragements. Il nous a initié avec une ardeur sans égale à la méthode des recherches scientifiques. De lui, nous avons appris la patience, la discipline, l'application quotidienne, et l'amour de la vérité.

Qu'il nous soit permis de lui témoigner, en retour de toutes ses bontés dont nous sommes profondément touché, nos sentiments d'admiration, de reconnaissance et d'affectueux respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR CLUZET  
*Professeur de Physique Biologique, Radiologie  
et Physiothérapie*  
*Membre correspondant de l'Académie de Médecine*  
*Chevalier de la Légion d'Honneur*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ ENSELME

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ REVOL  
*Pharmacien-Chef*  
*de l'Hôpital Départemental du Vinatier*

Qui veulent bien accepter d'être  
nos juges ; nous les en remercions  
très respectueusement.

A NOTRE ANCIEN MAITRE

MONSIEUR TSU MIN-YEE

*Directeur de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université Franco-Chinoise à Shanghai  
Membre de la Commission Politique Centrale  
de la République Chinoise  
Ancien Secrétaire d'Etat*

A NOTRE ANCIEN MAITRE

MONSIEUR SUNG WOO-SEN

*Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université Franco-Chinoise à Shanghai  
Directeur de l'Institut Belgico-Chinois du Radium  
à Shanghai*

A NOS MAITRES DE LA FACULTE  
DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITE  
FRANCO-CHINOISE A SHANGHAI

A MES AMIS

## AVANT-PROPOS

Le travail que nous présentons résume les recherches entreprises dans le Laboratoire de Chimie Biologique sur les spectres d'absorptions des protéines sous l'influence des rayons ultra-violets. Au cours de nos recherches, notre Maître, M. le Professeur G. Florence, nous a toujours guidé et nous a prodigué sympathiquement ses excellents conseils. Pour nous montrer élève fidèle et reconnaissant, nous nous consacrerons comme lui à la recherche scientifique.

Nous prions MM. les Professeurs Cluzet, Enselme, Revol, d'agréer l'expression de notre reconnaissance pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de faire partie du Jury de notre thèse.

Nous remercions cordialement M. Vincent, chef de travaux pratiques de chimie biologique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, de nous avoir souvent donné des renseignements utiles à notre travail.

Nous remercions également Mlle Bourriot : elle a beaucoup contribué à l'élaboration de nos recherches.

Nous n'oublions pas nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie de l'Université Franco-Chinoise de Shanghai : M. Tsu-Min-Yee, directeur de la Faculté de Pharmacie, et M. Sung-Woo-Sen. Qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.



# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES RAYONS ULTRA-VIOLETS SUR LES PROTEINES

---

## INTRODUCTION

L'action des rayons ultra-violet sur les substances biologiques a été observée depuis fort longtemps et le terme général de « photolyse » a voulu la traduire. Bierry, Victor Henri et Ranc, Daniel Berthelot et Gaudechon, tout récemment Guillaume et Tanret, ont étudié cette action sur les polysaccharides et démontré que, si les radiations ultra-violettes sont douées des propriétés hydrolysantes accusées sur les glucosides et les éther-sels, elles semblent par contre inactives sur les polyoses.

L'action sur les protéines semble beaucoup plus complexe. Guillaume et Tanret n'ont pu déceler de modifications sur les protéines, l'ovalbumine en l'espèce, et cependant nombre d'auteurs ont signalé des changements dans les caractéristiques physico-chimiques des protides après l'exposition plus ou moins longue à l'action des rayons ultra-violet d'une lampe à vapeur de mercure. C'est ainsi que Dreyer, Jansen, Rajewski, Spiegel Adolf ont observé que les albumines dissoutes : pseudo-globuline, ovalbumine, sérum-albumine, les milieux protéiniques complexes

tels que le sérum sanguin, peuvent, sous l'action des radiations ultra-violettes, se coaguler ou présenter certaines modifications physico-chimiques, non spécifiées du reste avec précision par ces auteurs.

Ponthus, en 1933, a étudié l'action d'un rayonnement ultra-violet sur les dissolutions aqueuses de la gélatine. De ses recherches, il a conclu que « les  
« particules de gélatine ni ne s'agrègent, ni ne se  
« désagrègent physiquement, qu'elles subissent cha-  
« cune en particulier une diminution réelle de leur  
« volume élémentaire par une déshydratation pro-  
« bable sous l'influence de l'irradiation subie, que  
« la diminution du volume élémentaire des parti-  
« cules entraîne une diminution de leur volume  
« total, donc un affaissement de la viscosité de la  
« solution ».

Ponthus admet en plus que l'irradiation ultra-violette produit une photolyse de la gélatine avec diminution du volume particulaire initial par clivage de la molécule et mise en dissolution de certains groupements aminés ainsi libérés.

Harris a étudié l'irradiation des protéines avec la lampe à vapeur de mercure. De ses recherches, il a conclu que l'action des rayons ultra-violets sur les acides aminés était un phénomène d'oxydation et que seuls le tryptophane et la tyrosine subissaient le processus oxydatif, augmenté d'ailleurs considérablement par l'hématoporphyrine, les chlorophylles, dont le rôle photodynamique avait été mis en lumière par Hausmann.

F. Lieben, dans une importante étude, a étudié la dégradation de la tyrosine et du tryptophane par les rayonnements ultra-violet. Ses recherches ont confirmé les travaux de Harris.

Soret, le premier, en 1883, a montré que le spectre ultra-violet des protéïdes était caractérisé par la présence à peu près générale d'une bande d'absorption aux environs de  $\lambda$  278 m $\mu$ . Dhéré, dans sa remarquable thèse concernant les recherches spectrographiques sur l'absorption des rayons ultra-violet par les albuminoïdes et leurs dérivés, a démontré que cette bande signalée par Soret était supportée dans la molécule protéique par les acides aminés cycliques. Blith, Stenström, Groh et Hanak ont confirmé ce travail et Vlès a démontré que la bande est supportée par le radical phenyl.

Holiday a confirmé tout récemment le rôle capital de la tyrosine et du tryptophane dans la courbe spectrale des protéines. Préparant un mélange de tyrosine et de tryptophane suivant les proportions indiquées par l'analyse chimique, étudiant ce mélange par la méthode spectrophotométrique, il a obtenu une valeur de dosage quantitatif de la proportion de ces acides aminés dans les protéines.

Nous nous sommes proposé, dans le présent travail, d'étudier par la méthode spectrographique les modifications subies par les protéines sous l'influence des rayons ultra-violet. Cette étude est poursuivie systématiquement dans le laboratoire du Pr. Florence. Il nous a chargé d'éclaircir en premier lieu l'effet de ces rayons sur les éléments constitutifs, en l'espèce

le tryptophane et ses dérivés, ainsi que sur la tyrosine. Cette étude, en effet, est essentielle pour mettre en lumière les modifications qui peuvent exister à la suite d'irradiation sur les molécules lourdes des protides.

## I. -- DESCRIPTION DU SPECTROGRAPHE

Nous empruntons cette description à l'article du Professeur Vlès, Archives de Physique biologique, mai 1934.

Le dispositif optique du spectrographe, entièrement enfermé dans un boîtier métallique, a son plan de symétrie vertical, et la fente est horizontale. D'après les données publiées par Jobin et Yvon (28), que nous résumons, le colimateur est un téléobjectif ayant une focale de 120 cm., constitué par un objectif divergent en quartz succédant à la fente et un miroir concave en acier inoxydable. Le faisceau lumineux renvoyé vers l'avant par ce premier miroir est replié sur une second miroir, en acier plan, lequel l'envoie à son tour sur le prisme : le faisceau lumineux décrit donc un trajet brisé, qui ramène le dispositif à un encombrement minimum. Le prisme de Cornu, d'arête horizontale, de  $4\frac{1}{2} \times 5$  cm. de faces, a ses deux moitiés adhérees optiquement. L'objectif de chambre a un diamètre de 6 cm. et une focale de 80 cm. Cet objectif est corrigé de l'aberration sphérique sur l'axe, est sans coma, sans astigmatisme, et la diacaustique est plane : le spectre est stigmatique avec correspondance point par point sur l'horizontale, et plan, de sorte qu'on peut utiliser les plaques photographiques en verre usuelles sans leur imposer une

courbure. Le spectre a environ 20 cm. de long entre 7.000 et 2.100 Å.

Les raies correspondent à une image de la fente réduite dans le rapport 1/2. Les plaques sont du format 9×24; une échelle de longueurs d'onde transparente peut, par l'action d'un levier extérieur, venir se superposer à la plaque et y donner impression par l'éclairage d'une petite lampe électrique dont le commutateur est sous l'appareil. La fente du spectrographe, horizontale, a, lorsqu'elle est entièrement découverte, une longueur de 18 mm. ; une série d'écrans permet d'en diminuer la longueur ou d'y découper diverses régions.

En particulier l'écran destiné aux enregistrements qualitatifs dont il sera question plus loin, découvre une longueur de fente de 9,4 mm. symétrique sur l'axe ; celui destiné à la comparaison spectrophotométrique de paires de spectres, deux orifices découvrant chacun 3,5 mm. de fente, la substitution des deux orifices adjacents se faisant avec un raccord exact sur l'axe de l'appareil (fig. 1). L'ensemble du système de diaphragmes servant aux mesures photométriques, et dont on trouvera la description plus loin, est placé sur le miroir concave du collimateur.

CHASSIS. — Le châssis métallique renfermant la plaque 9×24 se déplace devant une division millimétrique. Pour permettre la juxtaposition exacte des paires de spectres dans les mesures spectrophotométriques, il doit subir des déplacements rigoureusement calibrés : à cet effet, la table porte-châssis est munie, outre sa division, de deux chevilles for-

mant butoirs, que l'on peut déplacer dans deux séries de trous alternés placés à distances connues,

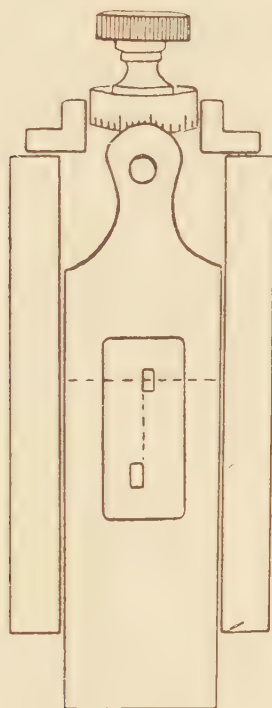


FIG. 1.

et sur lesquels le châssis vient s'arrêter dans sa course. On déplace alternativement les deux butoirs pour parcourir l'ensemble de la plaque. Ce dispositif soulage l'attention de l'opérateur et lui permet de travailler plus vite avec sécurité.

DISPOSITIF PHOTOMÉTRIQUE (fig. 2). — Le dispositif spectrophotométrique est constitué par deux joues

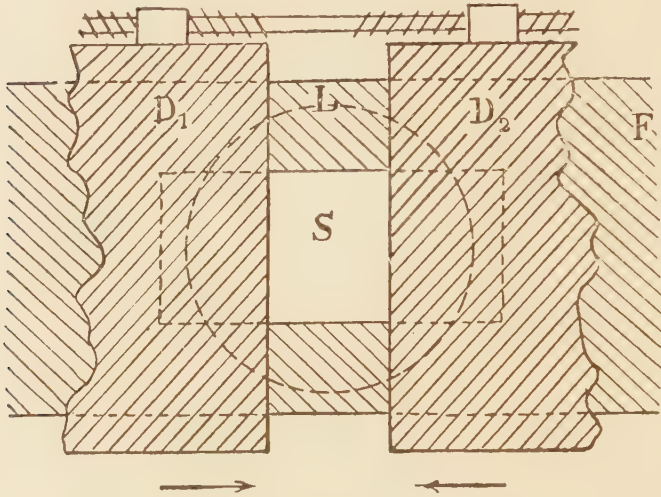


FIG. 2.

Schéma du diaphragme rectangulaire sur le collimateur. L: collimateur;  $D_1$   $D_2$ : joues mobiles; F: vanne fixe; S: surface découverte.

métalliques, de bords parallèles au plan de symétrie du spectrographe, et susceptibles de se déplacer symétriquement par rapport à celui-ci, en avant du miroir concave du collimateur. L'écart entre ces deux joues est repéré par un tambour donnant le centième de mm. et par un compteur de millimètres qui a sa division sous verre ; contre le diaphragme à joues mobiles, une vanne à joues parallèles distantes de 28 mm. dans le plan de symétrie de l'appareil limite les dimensions du flux, de façon à réaliser avec les joues mobiles un rectangle déformable dont

les deux côtés (parallèles au plan de symétrie) sont fixes et les deux autres (perpendiculaires au plan de symétrie) mobiles.

SOURCE. — La source principale du dispositif est constituée par une lampe à l'hydrogène Gallois avec circulation d'eau froide (fig. 3). Une différence de potentiel alternative de 120 volts, grossièrement impédable par une self, est connectée à un transformateur à fer fermé supportant environ 400 watts (450 watts maximum) et dont le secondaire fournit 2.000 volts

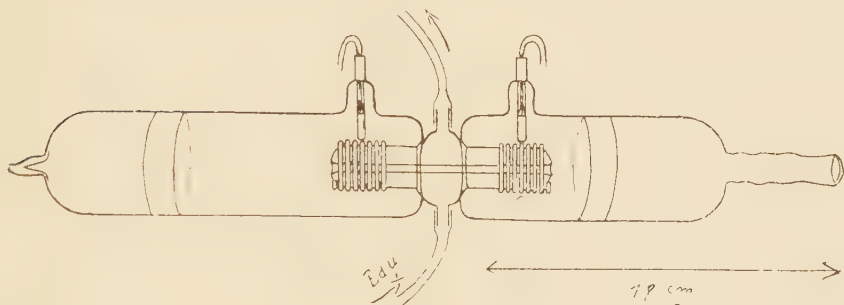
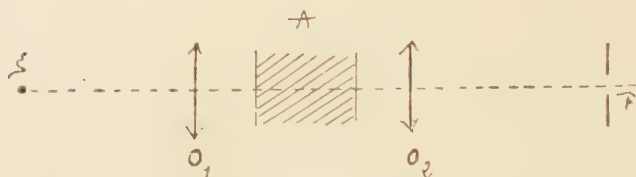


FIG. 3.

aux bornes du tube. Celui-ci est placé en bout devant le spectrographe, et limité par une fenêtre plane en quartz. L'image directe du tube lumineux telle qu'elle serait donnée sur la fente par une lentille de condensation unique serait défectueuse et non homogène. La source de lumière S est normalement placée au foyer de  $O_1$  situé à 18 cm. en avant de cet objectif. Le flux lumineux parallèle issu de  $O_1$  traverse l'absorbant A, puis vient tomber sur l'objectif  $O_2$ , focale 27 cm. qui a son foyer sur la fente F du spectrographe. Il en résulte que l'image de la source S se

forme sur la fente F avec un agrandissement égal à 27/18 ou 3/2.



Dans le modèle de lampe construit par la Maison Gallois, sur les conseils du Professeur Florence, la fenêtre en quartz se trouve à 18 cm. environ du tiers antérieur du capillaire qui a pour diamètre 5 mm. environ (voir fig. ci-dessus). Il importe de placer cette lampe au foyer de l'objectif  $O_1$  et d'éclairer la fente F avec un faisceau homogène sur une longueur de 3 mm.

Ces conditions ne se réalisent pas en une première fois, il est indispensable de faire plusieurs essais préliminaires avant d'obtenir de bons résultats. Ces essais doivent chaque fois être contrôlés en tirant des paires de spectres sur des plaques sacrifiées à cet effet. Une bonne précaution consiste à vérifier de temps en temps, tous les 15 jours par exemple, si aucun déplacement accidentel de la lampe n'est venu troubler l'homogénéité du faisceau lumineux (1).

(1) Des contrôles d'homogénéité des spectrères ont été réalisés au laboratoire de physique de la Faculté des Sciences par MM. Thover et Latarjet, que nous remercions ici bien cordialement.

Les deux lentilles sont à un intervalle de 39 cm. et la seconde a un diamètre utile de 35 mm., la première fournit une image du tube à 15 cm. en avant de la seconde, qui est placée à 23 cm. 5 de la fente. La couverture de cette dernière lentille par le flux émis par la première, est vérifiée au verre d'urane (puisque en raison du non-achromatisme des lentilles de quartz, la section du flux à cet endroit n'est pas identique pour l'ultra-violet et pour le visible). Entre les deux lentilles, un prisme à réflexion totale peut être introduit par basculement latéral, et substituer à la lumière de la lampe à hydrogène, celle d'un arc au mercure Gallois fonctionnant sur continu (125 volts, 4 ampères environ) placé latéralement à l'appareil, et pouvant servir aux réglages ; l'usage de celui-ci pour mesures spectrophotométriques exige l'atteinte préalable d'un régime (un quart d'heure de marche environ) stabilisé sur 80 volts et 3 ampères environ.

Le spectre à hydrogène obtenu est sensiblement continu. Les seules raies perceptibles sont, dans le visible, des raies de l'hydrogène (Balmer, etc.), dans l'ultra-violet une raie du Si (2.881,7 Å) et un groupe de raies du Si à 2.507-16-28 Å. Des diminutions de temps de pose à l'extrême de la sensibilité des plaques ne font apparaître aucune discontinuité.

#### SCHÉMA OPTIQUE.

F : fente du spectrographe disposée horizontalement. Longueur 18 mm. Un volet coulissant permet, soit de masquer la fente, soit de la subdiviser en 2 ou 3 parties, pour la prise de spectres de comparaison.

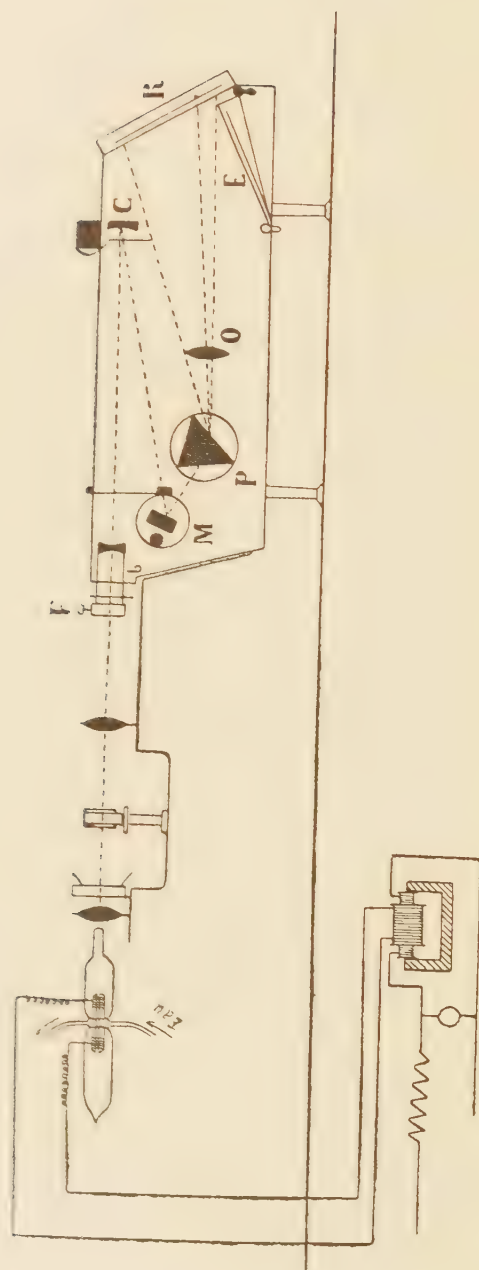


FIG. 4.

Cette fente est réglable en largeur à l'aide d'une vis micrométrique à tambour divisé, donnant  $1/100^e$  de mm. ; elle est réglable axialement à l'aide d'une crémaillère commandée par une clé à carré amovible, elle est réglable enfin en orientation au moyen de la même clé à carré amovible

C : miroir concave fixe ayant son foyer sur la fente F. Ce miroir est recouvert d'un alliage spécial bon réflecteur pour l'ultra-violet.

M. : miroir plan, réfléchissant vers le prisme P le faisceau parallèle issu du miroir concave C. Ce miroir M a deux mouvements de réglage : l'un déplace le spectre dans le sens de la longueur des raies, c'est-à-dire horizontalement et permet d'amener ce spectre exactement dans la fenêtre qui précède la plaque photographique ; l'autre mouvement, perpendiculaire au premier, permet d'amener le spectre en concordance avec l'échelle de longueurs d'onde. Ces deux mouvements sont commandés par des vis à tête carrée, à l'aide d'une clé à carré amovible, la même qui sert au réglage de la fente F. Quand cette clé est retirée, l'instrument est complètement à l'abri d'un dérèglement. Par surcroît de précautions, les têtes carrées des deux vis de réglage du miroir M sont masquées par des capuchons. Comme le miroir C, celui-ci est recouvert d'un alliage spécial bon réflecteur pour l'ultra-violet.

P : prisme de cornue, axe cristallographique au minimum de déviation. Arêtes de 45 mm. Les deux demi-prismes droit et gauche qui le constituent sont adhésés optiquement.

O : objectif en quartz, axe cristallographique suivant l'axe optique : triplet anastigmat à champ plan.

R : châssis recevant la plaque photographique de  $9 \times 24$  cm. Le spectre a une étendue de 20 cm. environ, de 7.000 à 2.100. Il est plan et anastigmatique. Le châssis est mobile latéralement, au moyen d'une crémaillère pour la prise de spectogrammes multiples sur une même plaque. Une règle divisée en millimètres permet de mesurer les déplacements du châssis.

E : échelle de longueurs d'onde ; elle a 2 positions : une position d'escamotage (celle de la figure) et une position de service ; on passe de l'une à l'autre par la manœuvre d'un levier. Quand l'échelle est en service, l'inscription de ses divisions et chiffres se fait sur cette plaque grâce à la lumière fournie, pendant quelques secondes, par une petite lampe électrique munie d'un interrupteur et disposée à la partie inférieure de la boîte.

RÉGLAGE DU SPECTROGRAPHE. — Nous n'insisterons pas sur le réglage du spectrographe lui-même, que tout spécialiste comprendra d'après les indications suivantes, données par M. Vlès. (Il pourrait d'ailleurs n'être pas sans danger de le laisser à la portée des mains de tous les usagers de l'appareil) (1).

Le réglage des diverses parties du spectrographe

(1) Nous remercions M. Tardy, ingénieur de MM. Jobin et Yvon, de l'obligeance qu'il a voulu nous témoigner en venant lui-même régler l'appareil dans notre laboratoire ; et M. Vlès pour les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer avec sa bienveillance coutumière.

Jobin-Yvon se fait, pour un élément (rotation de la fente sur l'axe), au moyen d'une vis externe ; pour deux éléments (collimateur, miroir plan) au moyen de têtes de vis carrées logées sous des capuchons vissés, les protégeant de toute atteinte extérieure, et permettant les réglages boîte fermée ; pour d'autres il est nécessaire d'ouvrir la boîte et d'agir directement sur le dispositif (miroir concave, prisme, objectif). Le réglage du collimateur se fait comme d'habitude par autocollimation, en introduisant en avant de  $M_2$  un miroir plan susceptible de renvoyer sur ses pas le rayon issu du collimateur ; avec une fente large, sur une moitié de laquelle à l'extérieur on a placé un prisme à réflexion totale, on observe l'image de la fente sur elle-même, en modifiant le tirage de la fente et de la première lentille au moyen de la clé b. Il y a intérêt à faire ce réglage avec interposition d'un écran bleu ou vert. Un premier léger réglage du miroir concave  $M^1$  doit permettre de couvrir le miroir  $M^2$ , et de ramener éventuellement le faisceau lumineux dans le plan de symétrie du spectrographe ; de même en réglage du miroir plan  $M^2$  approximatif, en inclinaison par la clé c et en azimuth par la vis  $c^1$  doit permettre de couvrir la face d'entrée du prisme. Le réglage du prisme, et en particulier la recherche, par rotation, du minimum de déviation pour une région spectrale déterminée, n'est pas libre puisque la division en longueur d'onde est faite d'avance et qu'on doit se borner à assurer la coïncidence des raies du spectre image avec les divisions de l'échelle, c'est-à-dire s'assurer que l'étales-

ment des diverses régions spectrales coïncide bien avec celui que le constructeur a donné à l'échelle. Ce premier réglage obtenu par de légères rotations du support du prisme n'est qu'approximatif et on ne doit chercher qu'une égalité d'étalement total et partiel sans insister sur la coïncidence des raies avec les divisions : ce réglage définitif sera fait au moyen du miroir plan en fin d'opération. Le réglage de l'objectif de chambre se fait par tirage direct à la main, après avoir pris soin de tracer au canif quelques marques en échelons sur la douille de l'objectif.

Le réglage du miroir plan mérite une description particulière en ce que c'est lui qui permet le réglage final des longueurs d'onde. Il doit être effectué avec une source à raies (arc au mercure), le châssis en place ouvert, et un verre dépoli ou un verre d'urane placé dans celui-ci : ces verres porteront des marques repérées d'après l'échelle des longueurs d'onde. Le réglage consiste à décaler le spectre par des déplacements alternatifs du miroir, jusqu'à amener des raies connues en coïncidence avec leurs marques. Pour faciliter ces approximations successives, M. Vlès a muni la clé carrée, qui commande le miroir, d'une aiguille d'une dizaine de centimètres, laquelle se déplace sur une division de la paroi extérieure du dispositif. Cette division est étalonnée en mm de déplacement d'une raie connue (2.546) par rapport à sa position numérique sur l'échelle. Ce réglage, effectué d'abord pour le visible avec un verre dépoli ou l'échelle elle-même, doit évidemment être vérifié pour les raies ultra-violettes avec un verre d'urane, puis photographiquement, et rectifié s'il y a lieu par

de petits déplacements en utilisant les indications de l'aiguille.

Le réglage du dispositif spectrophotométrique consiste à chercher d'abord le rectangle maximum de l'ouverture du diaphragme dont la projection puisse s'inscrire dans le cercle du miroir concave, puis vérifier, en interposant des feuilles de papier blanc (ou éventuellement une feuille de papier photographique lent) au niveau de la face d'entrée du prisme, si l'éclairement de cette face d'entrée est homogène, en particulier dans les régions du flux qui correspondent aux angles du rectangle. On prendra comme valeur maxima limite du rectangle la plus grande surface compatible avec la condition d'homogénéité.

Etant donné l'importance capitale de ce réglage, il sera nécessaire de le contrôler souvent en tirant des clichés obtenus par l'éclairage à la lampe à mercure. Les raies de mercure, nombreuses et bien délimitées, servent en effet de repère facile.

CUVES (fig. 5). — Nous avons utilisé soit des cuves de 10 mm. 5 d'épaisseur de la Maison Jobin et Yvon,

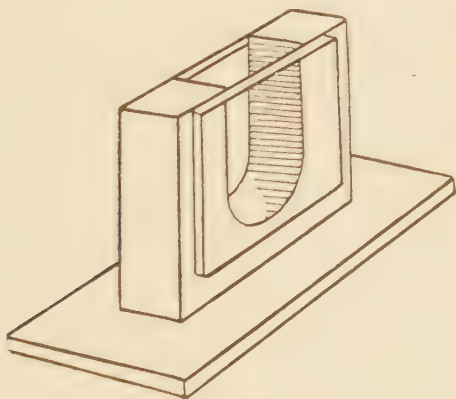


FIG. 5.

soit des cuves de la Maison Zeiss. Ce sont des cuves d'épaisseur constante. Elles sont réalisées au moyen d'étriers de verre sur les faces extérieures polies desquels on appuie et lutte à la paraffine deux lames de quartz plan parallèles, d'axe optique perpendiculaire à la lame. Ces cuves peuvent être d'épaisseurs diverses autour de l'ordre du centimètre par exemple. (Pour les solutions non aqueuses dans le solvant desquelles la paraffine serait soluble, on remplacerait celle-ci par de la colle, lavée, après mise en place dans un bain de chloroforme).

## II. -- TECHNIQUE DETAILLEE D'UNE OPERATION PRATIQUE

1° PRÉPARATION DES SOLUTIONS. — Précautions à prendre : la verrerie doit avoir subi des nettoyages extrêmement soignés au carbonate de soude, puis au bichromate de potassium concentré, puis à l'eau distillée. Il faut ensuite la sécher à l'étuve. Se rappeler que sur les parois d'un flacon usuel, des traces de certaines substances organiques résistent à plusieurs lavages sommaires, en quantités suffisantes pour intervenir dans le spectre de la nouvelle substance que l'on mettra dans le flacon. Pour les solutions extrêmement diluées, qui sont souvent nécessaires dans la mesure spectrophotométrique, il est préférable de partir de verrerie neuve qui sera par la suite exclusivement réservée à l'usage des solutions pour l'ultra-violet. Eviter les verres cédant exagérément de l'alcali. Se méfier des chiffons, des torchons. Eviter les traces de doigts sur les portions de verrerie venant en contact avec les solutions (goulots de bouteilles, bouchons, bouts de pipettes, agitateurs, etc...), les bouchons de liège, ou mieux les bouchons émeri doivent être soigneusement lavés. Eviter le contact des bouchons avec la table et pour cela les garnir d'une collerette de papier (fig. 6) (épinglée sur le bouchon

de liège ou placée à la tige du bouchon émeri), destinée à éviter d'une part que les poussières ne tombent sur le goulot du flacon et, d'autre part, que l'on puisse accidentellement réaliser un contact du bouchon avec la table en le posant tête en bas, sur celle-ci.



FIG. 6.

Pour les pipettes, après nettoyage au bichromate comme pour les flacons, les garder pointes en l'air recouvertes d'une floche de coton neuf ou d'un entonnoir en papier ; garnir comme les bactériologistes, l'extrémité que l'on porte à la bouche d'un léger tampon de coton pour éviter toute projection protéique dans le liquide de la pipette.

Le lavage initial ou final des cuves doit être effectué d'abord avec une solution de carbonate de soude, puis avec un bain prolongé de bichromate sulfurique, et enfin des lavages à l'eau distillée. Les joues de quartz, devant être traversées par l'ultra-violet, ne doivent bien entendu être touchées ni par les doigts, ni par un chiffon, depuis le lavage initial jusqu'à l'utilisation. N'employer pour ce nettoyage que des floches neuves de coton hydrophile chirurgical que l'on jette aussitôt après l'emploi.

2° ALLUMAGE DE LA SOURCE. — Attendre quinze à vingt minutes l'état de régime avant de prendre la première plaque.

3° CHARGE DU CHASSIS. — Avec des plaques 9×24.

4° PRÉPARATION DU SPECTROGRAPHE. — Installer la cuve remplie de solvant sur son support ; ouvrir l'écran qui permet le passage du faisceau lumineux et vérifier qu'il traverse bien la cuve avant d'arriver sur la fente ; laisser retonber l'écran. Vérifier la largeur de la fente (0,05) et la placer du côté solvant. Placer, au moyen du tambour divisé, le diaphragme du collimateur sur la valeur de départ (par exemple : 2,7) et le châssis sur le butoir correspondant à la division initiale 0,15. Préparer le métronome, le remonter, et vérifier qu'il correspond à 168 battements par minute. Ouvrir le châssis.

5° PREMIÈRE POSE. --- En utilisant la lampe à hydrogène que l'on ne peut éteindre dans l'intervalle des poses photographiques, celles-ci se font au moyen d'un écran que l'on déplace devant la lentille de projection, grâce à un dispositif de déclic (tuyau et poire qui part de l'écran, arrive à portée de la main de l'opérateur, et lui permet de maintenir à volonté l'écran ouvert ou fermé).

Déclencher le métronome. Après un léger entraînement pour se mettre aussi parfaitement que possible à l'unisson, compter en cadence de 1 à 13, en faisant coïncider les nombres impairs avec les battements du métronome : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13. Le premier temps correspondant à l'ouverture de l'écran qu'on laisse retomber au treizième (Septième battement du métronome).

6° MANŒUVRE DE DÉPLACEMENT. — Déplacer le châssis sur le butoir suivant (division 0,6) ; mettre le diaphragme du collimateur sur la valeur suivante (3,27) ; écouter le métronome et faire la pose suivante comme précédemment. Déplacer la fiche de l'abaque.

7° SPECTRES SUCCESSIFS. — Effectuer ainsi 14 spectres correspondant aux spectres-solvants du tableau ; puis pousser le châssis à la division 7,0, relever l'échelle de longueurs d'onde pour qu'elles s'applique sur la plaque, allumer l'ampoule d'éclairage de l'échelle pendant un top, rabaisser l'échelle à sa position de repos, et replacer le châssis sur le butoir à la division 6,5.

Reprendre la cuve, la vider du solvant, la rincer avec une première portion de solution que l'on jette, la remplir de solution définitive (même niveau de liquide que pour le solvant) et la remettre en place. Modifier l'écran de fente (côté substance). Remonter le métronome. Puis effectuer successivement les 14 spectres correspondant aux spectres substances du tableau, en allant du diaphragme 14,5 et de la position du châssis 6,5 au diaphragme 27,00 et à la position du châssis 0,15 au moyen des butoirs successifs. Enfin fermer le châssis, l'enlever et le développer.

8° DÉVELOPPEMENT. — Les clichés spectrophotométriques se développent comme les clichés ordinaires avec un révélateur approprié :

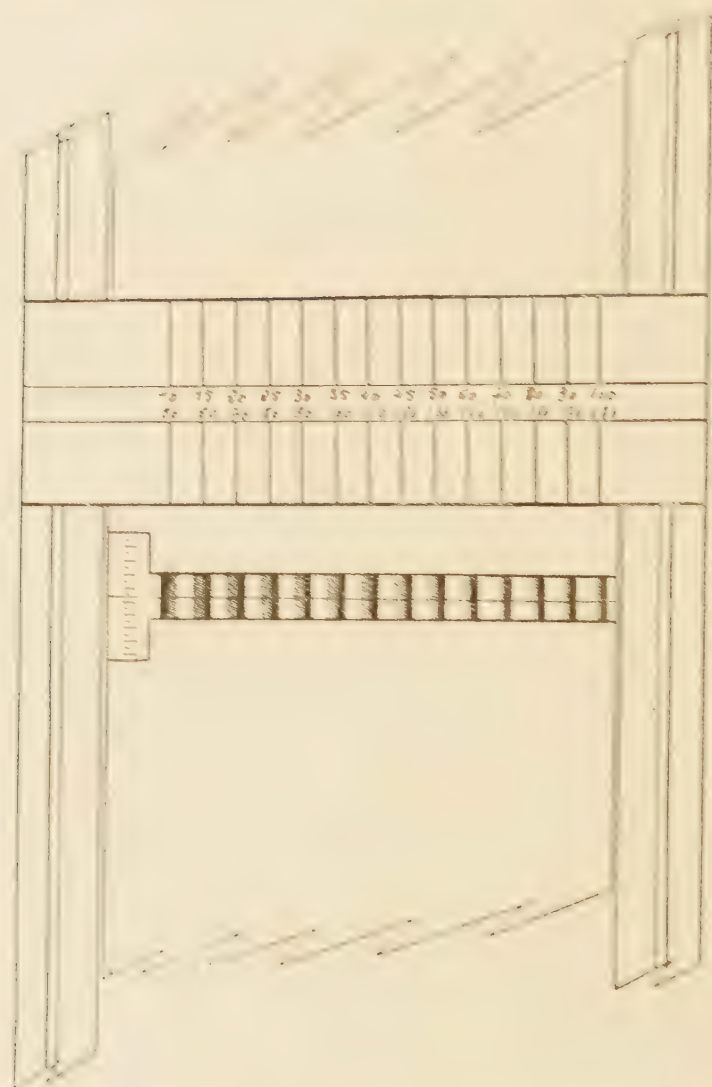
|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| Métol . . . . .                        | 5 gr.  |
| Sulfite de soude anhydre . . . . .     | 40 gr. |
| Hydroquinone . . . . .                 | 6 gr.  |
| Carbonate de potasse anhydre . . . . . | 40 gr. |
| Bromure de potassium . . . . .         | 4 gr.  |
| Eau pour un litre.                     |        |

9° LECTURE DU CLICHÉ. — Il n'est pas indispensable d'attendre que le cliché révélé, dépouillé et lavé soit sec pour en effectuer la lecture. Celle-ci peut souvent déjà être faite, avec avantage sur le cliché encore mouillé, au sortir du bain de lavage. Dans les deux cas placer la plaque au-dessus du mégatroscope (fig. 7) ou d'un simple verre dépoli éclairé par-dessous, et effectuer la lecture, c'est-à-dire : observer une paire de spectres, la suivre d'un bout à l'autre de l'échelle des  $\lambda$  et  $y$  repérer les diverses égalités de noircissement qui peuvent s'y présenter. Autrement dit, chercher à cologarithme constant, les longueurs d'ondes d'égalité.

La lecture faite, tracer la courbe colog.  $I/I_0 = f(\lambda)$  sur papier quadrillé dont 1 cm. correspond à 10 m $\mu$  d'abscisses. Cette courbe représente l'absorption de la substance examinée.

Calculer ensuite éventuellement la constante d'absorption K. Il faut aboutir soit à déterminer la constante d'absorption K de la loi de Beer Lambert ( $I = I_0 10^{-k^c}$ ) et c'est alors la courbe  $K = f(\lambda)$  qui est le but final ; soit, si la loi de Beer ne s'applique

pas au système étudié, à établir un faisceau de courbes colog. 1.  $l_0 = f(c, l, \lambda)$ . Dans les deux cas, il faut



envisager l'établissement de plusieurs clichés pris dans des conditions différentes dont les courbes représentent la synthèse.

## PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Toutes nos solutions ont été préparées dans de l'eau bi-distillée pure, avec des produits de provenances diverses (Merck, Hoffmann-Laroche. Pur Poulenc. Collection du laboratoire). Chacun d'eux a été, avant l'usage, soigneusement purifié par nos soins. Les solutions ont été titrées pondéralement. D'une façon habituelle nous utilisons une solution mère préparée dans l'eau pure ou de la soude N/100. Un tiers de cette solution était alors dilué dans 2 volumes, soit d'eau, soit de soude titrée, soit d'acide chlorhydrique titré de manière à obtenir le pH désiré.

Une certaine quantité (20 cm<sup>3</sup> en moyenne) était alors versée dans une plaque de Pétri, et l'ensemble soigneusement pesé.

La plaque de Pétri était alors portée dans un vaste cristalliseur rempli d'eau fréquemment renouvelée pour refroidir et éviter l'échauffement produit par la lampe à mercure.

Celle-ci était une lampe Gallois type S 31, marchant à 115 volts. On la laissait fonctionner à plein régime pendant 50 minutes avant d'exposer les solutions. La lampe se trouvait à 50 cm. de la surface du liquide.

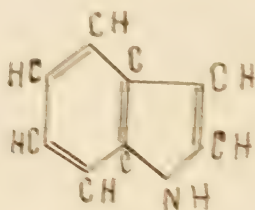
Dès l'exposition terminée, les plaques de Pétri

étaient à nouveau pesées et la perte d'eau provenant de l'évaporation, compensée exactement par de l'eau distillée.

Les clichés étaient pris aussi rapidement que possible après l'exposition.

A. -- Etude spectrographique de l'influence, en fonction de pH, du rayonnement ultra-violet sur les solutions aqueuses du noyau indolique et de ses dérivés.

### ETUDE SPECTROGRAPHIQUE DE L'INDOL



Nous avons utilisé l'indol pur Merck. L'échantillon commercial a été purifié par plusieurs cristallisations au sein de l'eau bouillante. Le produit obtenu avait son point de fusion à 52°. La substance a été dissoute dans l'eau à la concentration de 0,10 0 00. Le spectre de l'indol a été décrit par Dhéré, puis par Frideli. Ce dernier auteur a opéré au sein de l'hexane. Il a trouvé une courbe montant très vite depuis  $\lambda$  3030 Å° jusqu'à une première bande étroite à 2869. Elle remonte ensuite pour présenter, après trois bandes étroites, une bande large à 2650. Elle redescend ensuite jusqu'à un minimum pour  $\lambda$  2380.

et remonte en présentant une dernière bande large à  $\lambda 2170$ .

La courbe obtenue par nous, au sein de l'eau à pH 10, correspond presque exactement avec celle de Frideli. Notre courbe monte très vite depuis 293 et présente au Col. I/I° 62,5 une première bande étroite à  $\lambda 288$  ; après une descente à Col. I/I° 58. La courbe remonte sur  $\lambda 2800$  pour, à Col. I/I° 70, présenter un épaulement qui l'infléchit jusqu'à  $\lambda 2720$  Col. I/I° 80. Ici se présente une large bande jusqu'à  $\lambda 2640$  où elle descend brusquement jusqu'à un minimum à Col. I/I° 25  $\lambda = 2380$ . Elle remonte ensuite pour s'infléchir en une bande large à  $\lambda 2210$ .

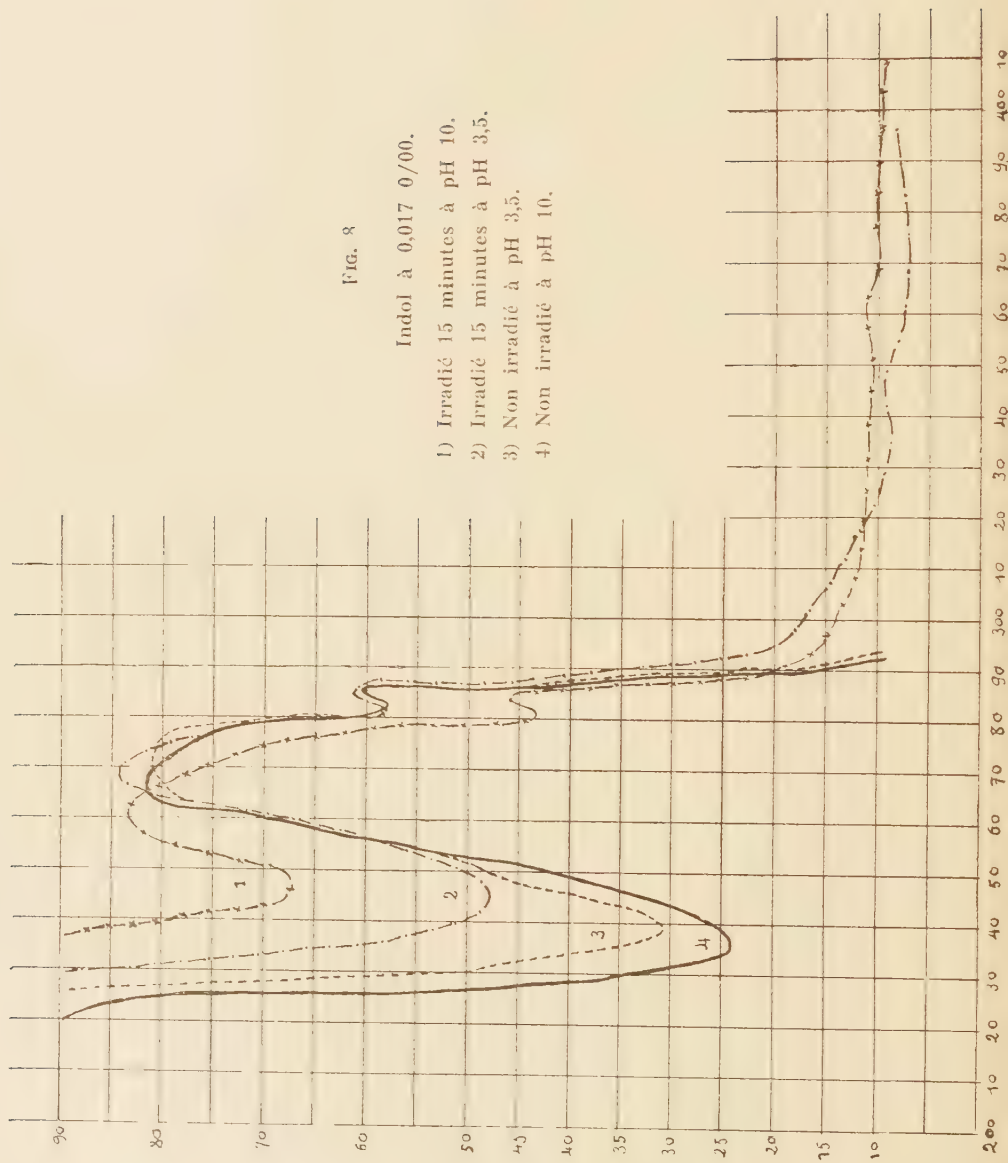
A pH 3,5, la partie initiale de la courbe se juxtapose presque exactement à celle obtenue précédemment ; on retrouve la même bande étroite à  $\lambda 288$ , la même bande large au niveau de Col. I/I° 80, mais un peu déviée vers les grandes longueurs d'ondes à  $\lambda 277$ . Le minimum d'absorption est, lui aussi, dévié à  $\lambda 2400$  au lieu de  $\lambda 2380$ , la bande est plus étroite et l'absorption est plus forte.

On sait, depuis les belles recherches de Vlès et Gex sur le comportement des composés cycliques, benzène et acide benzoïque, en milieu aqueux et sur leur absorption ultra-violette en fonction du pH, que la molécule de benzène ne paraît pas inerte vis-à-vis des ions  $H^+$  ou des équilibres électrolytiques de la solution. Les spectres sont, en effet, différents et le rapport  $\varphi$  en fonction du pH du Col. I/I° sur deux longueurs d'ondes donne une courbe sinueuse caractéristique. Malgré la modification, certaine de la courbe,

Fig. 8

Indol à 0,017 0/00.

- 1) Irradié 15 minutes à pH 10.
- 2) Irradié 15 minutes à pH 3,5.
- 3) Non irradié à pH 3,5.
- 4) Non irradié à pH 10.



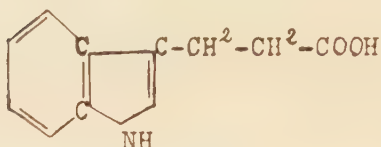
les modifications observées par nous sont cependant moins accusées que celles données par le benzène, ou  $C^6H^5-COOH$ , comme si la soudure du noyau pyrrolique conférait à l'ensemble moléculaire une certaine stabilité.

EFFET DE L'IRRADIATION PAR LES RAYONS  
ULTRA-VIOLETS.

Les deux solutions, alcaline et acide, de l'indol ont été exposées aux rayons dans des conditions rigoureusement identiques. Comme on peut le voir par les courbes ci-jointes (voir fig. 8), la modification subie par la molécule diffère très notablement : si l'une et l'autre présentent une absorption qui s'étend jusqu'à  $\lambda$  400 m $\mu$ , par contre, en milieu acide, l'épaulement dû à la bande étroite vers  $\lambda$  288 n'a pas été déplacé, bande qui par contre est nettement descendue sur les courbes obtenues avec la solution alcaline. De plus, en milieu acide, on retrouve l'allure générale de la courbe de l'indol avec, cependant, une absorption plus marquée. La modification moléculaire est beaucoup plus accusée en solution alcaline.

Une irradiation plus prolongée, (30'), aboutit du reste à une dislocation telle que toute la courbe en est effacée malgré que persistent les réactions colorées de l'indol par l'apparition d'un produit d'oxydation (?) qui masque l'indol restant en solution. En milieu acide, l'irradiation doit être prolongée beaucoup plus longtemps (3 heures) pour obtenir un pareil résultat.

## ACIDE INDOL-3-PROPIONIQUE



Nous avons utilisé l'acide indol-3-propionique Hoffman-Laroche purifié, concentration à 0,030 0/00.

L'adjonction à ce noyau de l'indol d'une chaîne aliphatique, diminue à concentration égale l'absorption. Il y a là confirmation de la loi générale fixée par Castille et Mlle Rupoll. Friedli a démontré que la courbe du scatol ressemble beaucoup à celle de l'indol, avec, cependant, un déplacement vers le rouge d'environ 15 A° et un fusionnement des bandes étroites.

Ces caractères s'accusent sur l'acide indol-3-propionique. A concentration moléculaire égale, on retrouve les spectres de l'indol et du scatol, mais les bandes étroites ont presque complètement disparu, sauf cependant le premier épaulement à  $\lambda$  388 qui se retrouve dans les mêmes conditions que pour l'indol et le scatol.

De plus, la large bande de l'indol est déportée de 10  $\lambda$  vers les grandes longueurs d'ondes. Au niveau de  $\lambda$  272 la courbe descend brusquement (au lieu de 264 pour l'indol). Elle descend jusqu'à un minimum à Col. I/I° 25 à  $\lambda$  245 au lieu de  $\lambda$  238 pour l'indol). Elle remonte ensuite pour s'infléchir sur une large bande à  $\lambda$  230 (au lieu de 220 pour l'indol).

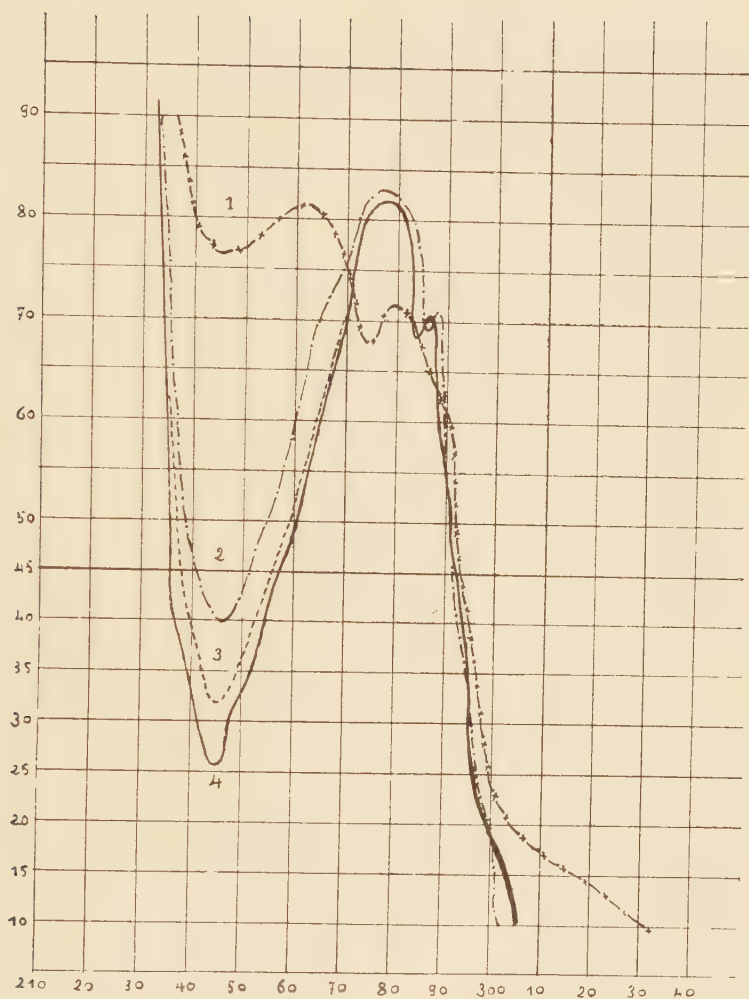


FIG. 9

Acide indol-3-propionique à 0,030 0/00.

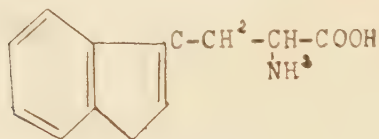
- 1) Irradié 15 minutes à pH 11.
- 2) Irradié 15 minutes à pH 3,5.
- 3) Non irradié à pH 3,5.
- 4) Non irradié à pH 11.

Les deux spectres des solutions acide et basique de l'acide indol-3-propionique présentent les mêmes légères différences que celles signalées pour l'indol. L'action des rayons ultra-violetes sur l'acide indol-3-propionique donne des différences encore plus accusées que l'indol, suivant que l'on se place en milieu alcalin ou en milieu acide.

Dans ce dernier cas, seule est modifiée la large bande vers  $\lambda 245$ . On constate une absorption plus forte comme dans le cas de l'indol, mais la bande étroite vers  $\lambda 388$  persiste inchangée.

Au contraire, une exposition de 15 minutes de la solution alcaline amène une modification considérable que traduit exactement la courbe. On ne reconnaît plus la figure spectrale du noyau indolique, et seul subsiste un plateau avec deux larges bandes à  $\lambda 270$  et  $\lambda 240$ .

ACIDE  $\beta$  INDOL  $\alpha$  AMINO-PROPIONIQUE  
(TRYPTOPHANE)



La courbe d'absorption du tryptophane a été étudiée par nombre d'auteurs (Dhéré, Victor Henri, Holiday, etc...). Holiday a décrit deux courbes : l'une obtenue avec l'acide aminé dissous dans HCl N/10, l'autre dans NaOH N/10. Les deux courbes diffèrent

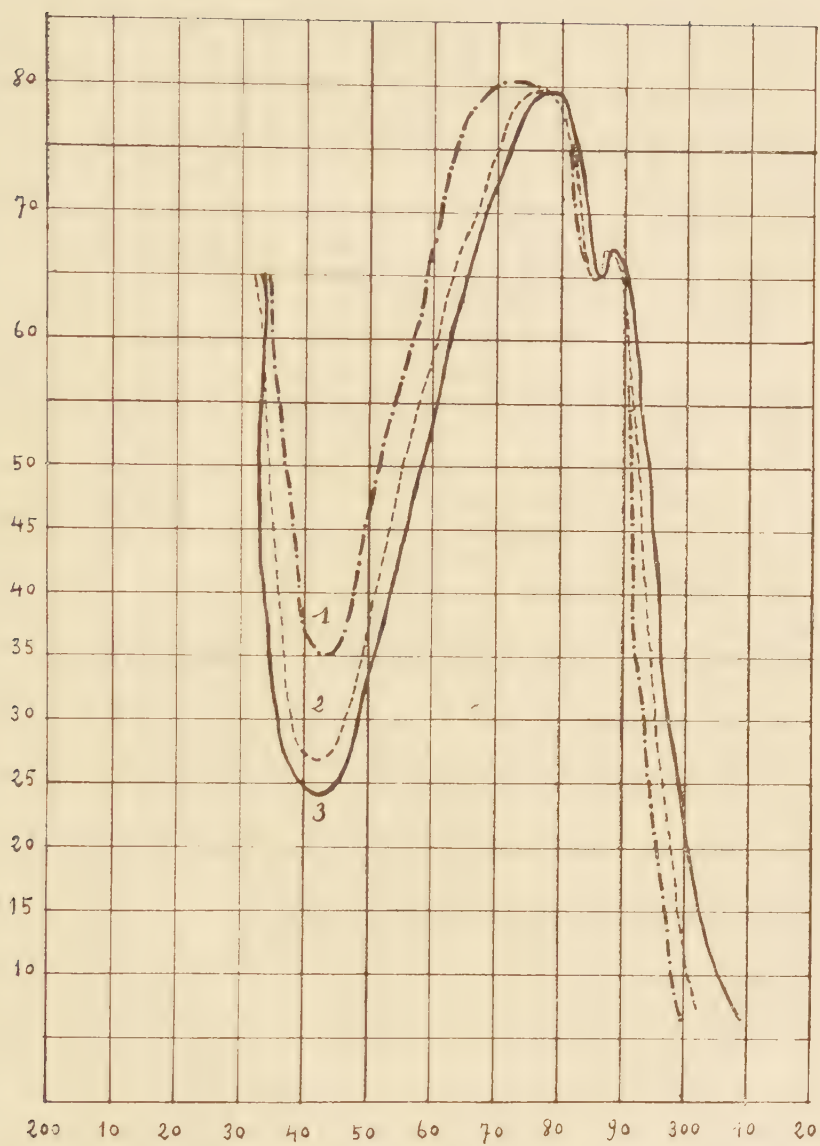


FIG. 10

Tryptophane à 0,030 g/100.

- 1) Non irradié à pH 6.8.
- 2) Non irradié à pH 8.
- 3) Non irradié à pH 11.

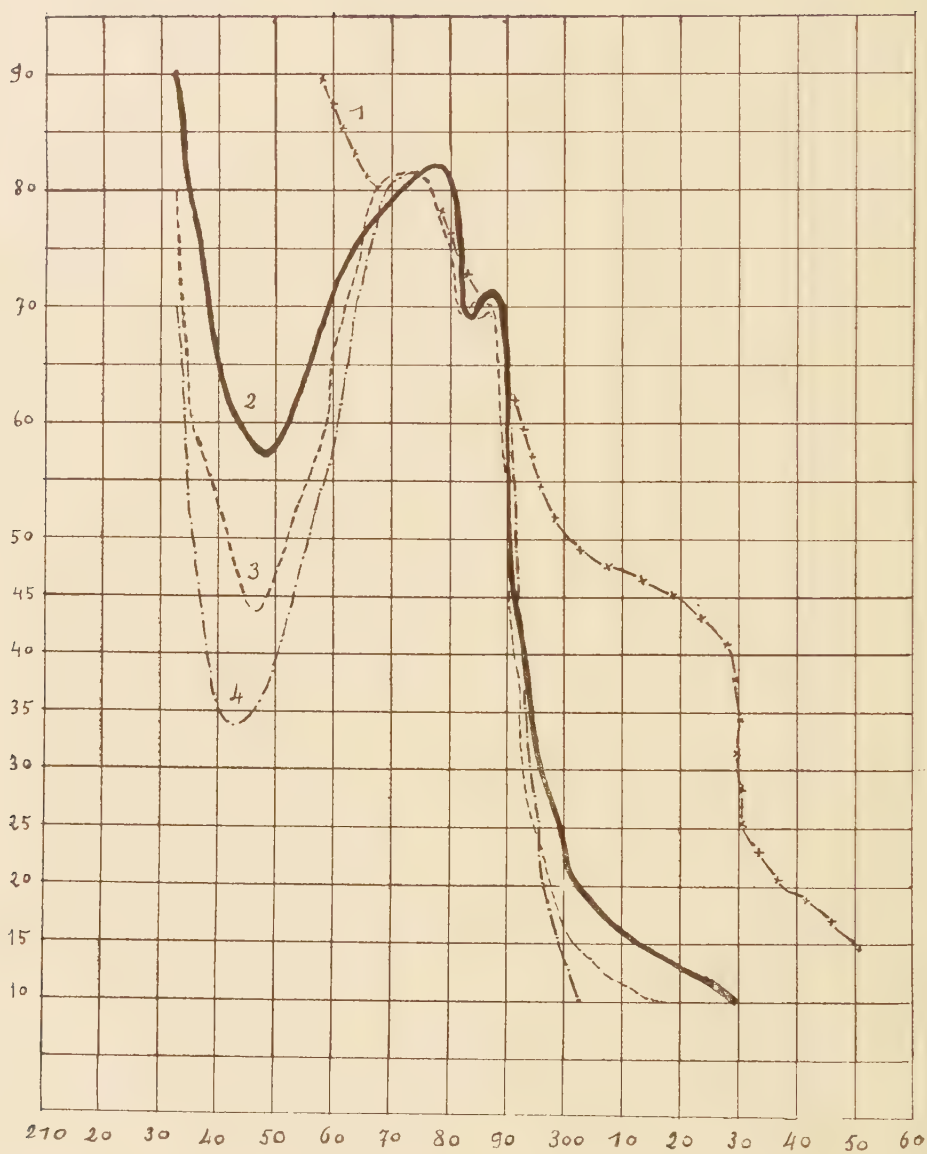


FIG. 11

Tryptophane à 0,030 0/00.

- 1) Irradié 15 minutes à pH 11.
- 2) Irradié 15 minutes à pH 8.
- 3) Irradié 15 minutes à pH 6,8.
- 4) Irradié 15 minutes à pH 4,4.

quelque peu: si la partie ascendante se juxtapose, par contre, l'absorption est plus marquée avec la solution acide.

Nous avons repris systématiquement l'étude de l'absorption du tryptophane en fonction du pH. Comme l'indique le tableau ci-contre, c'est entre pH 7 et 8 que se produit la transformation de l'allure générale de la courbe signalée par Holiday. Il ne semble donc y avoir aucune corrélation entre cette modification et les pK du tryptophane qui sont respectivement :

|         |   |                    |
|---------|---|--------------------|
| COOH pK |   | NH <sup>2</sup> pK |
| 2,38    | , | 9,39               |

au fur et à mesure que s'élève le pH, l'absorption diminue vers  $\lambda$  245 pour acquérir une stabilité à pH 10-11.

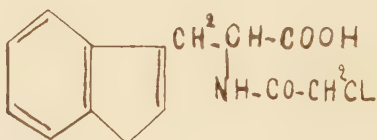
L'intensité de l'attaque des rayons ultra-violets sur la molécule du tryptophane est, par contre, extrêmement influencée par le pH de la solution.

Tandis que, jusqu'à pH 6,8, la modification est de même ordre que pour les molécules précédemment étudiées, par contre à pH 7,6 la destruction s'accuse, et à pH 11,7, la destruction est presque complète.

Il y a donc une différence très nette entre l'intensité dans une attaque sur le tryptophane et sur l'acide indol-3-propionique. Il semble que l'addition sur la molécule du groupement NH<sup>2</sup> en  $\alpha$  confère à cette dernière une grande fragilité. Il était intéressant de voir si, en fixant cette fonction, la labilité diminuait.

### CHLORACETYL- $\alpha$ -TRYPTOPHANE

Pour nous rendre compte de l'influence du groupement aminé dans la fragilité de la molécule du tryptophane aux rayons ultra-violet, nous avons étudié les effets de l'irradiation sur la molécule du chloracétyl- $\alpha$ -tryptophane.



Le groupement aminé est ici bloqué par amidification et ne peut donc pas intervenir.

Le spectre général de l'acide rappelle celui du tryptophane, à quelques variantes près. Il était à prévoir que l'adjonction à la molécule d'un groupement  $\text{CH}^2\text{CL}-\text{COOH}$ , peu absorbant, diminuant donc à concentration égale l'absorption, la courbe s'en ressentirait. Le fait s'est confirmé, ainsi que l'atteste la courbe. Cependant on retrouve la bande étroite à  $\lambda 288$ . De plus le minimum d'absorption, au lieu de se trouver à  $\lambda 240$ , comme pour le tryptophane, est déporté de  $\lambda 5$  et se trouve à  $245$ .

Enfin les deux courbes prises à pH 4 et à pH 11 ont une telle similitude qu'elles se confondent d'une façon presque complète.

Les effets de l'irradiation sont infiniment moins accusés que sur le tryptophane lui-même. On retrouve, il est vrai, l'augmentation générale de l'ab-



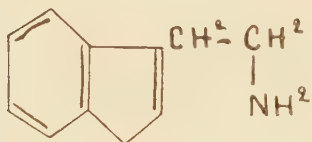
FIG. 12

Chloracétyl- $\alpha$ -tryptophane à 0,030 g/100.

- 1) Irradié 15 minutes à pH 11.
- 2) Irradié 15 minutes à pH 4.
- 3) Non irradié à pH 11.

sorption attestant une destruction partielle par oxydation (?) de la molécule. Mais l'allure générale de la courbe se retrouve parfaitement et, fait important, la destruction n'est pas plus accusée en milieu alcalin qu'en milieu acide. Les deux courbes se confondent presque parfaitement. On peut donc en conclure que le blocage de la fonction  $\text{NH}^2$  a donné à la molécule du tryptophane, une stabilité considérable vis-à-vis des rayons ultra-violets, et que cette stabilité se retrouve quelle que soit la réaction du milieu.

### TRYPTAMINE



Pour élucider le rôle du groupement  $\text{NH}^2$  dans la fragilité moléculaire du tryptophane, il nous a paru intéressant d'étudier le comportement de la tryptamine résultant de la décarboxylation de l'acide indol-amino-propionique.

Les spectres de la tryptamine en milieu acide et alcalin présentent une remarquable analogie avec ceux du tryptophane. L'influence du carboxyl  $\text{COOH}$  est insignifiante sur une molécule aussi lourde que celle de l'acide indol-amino-propionique.

Mais tandis que l'irradiation en milieu acide à pH 4,4 n'apporte, pour ainsi dire, aucune modifica-

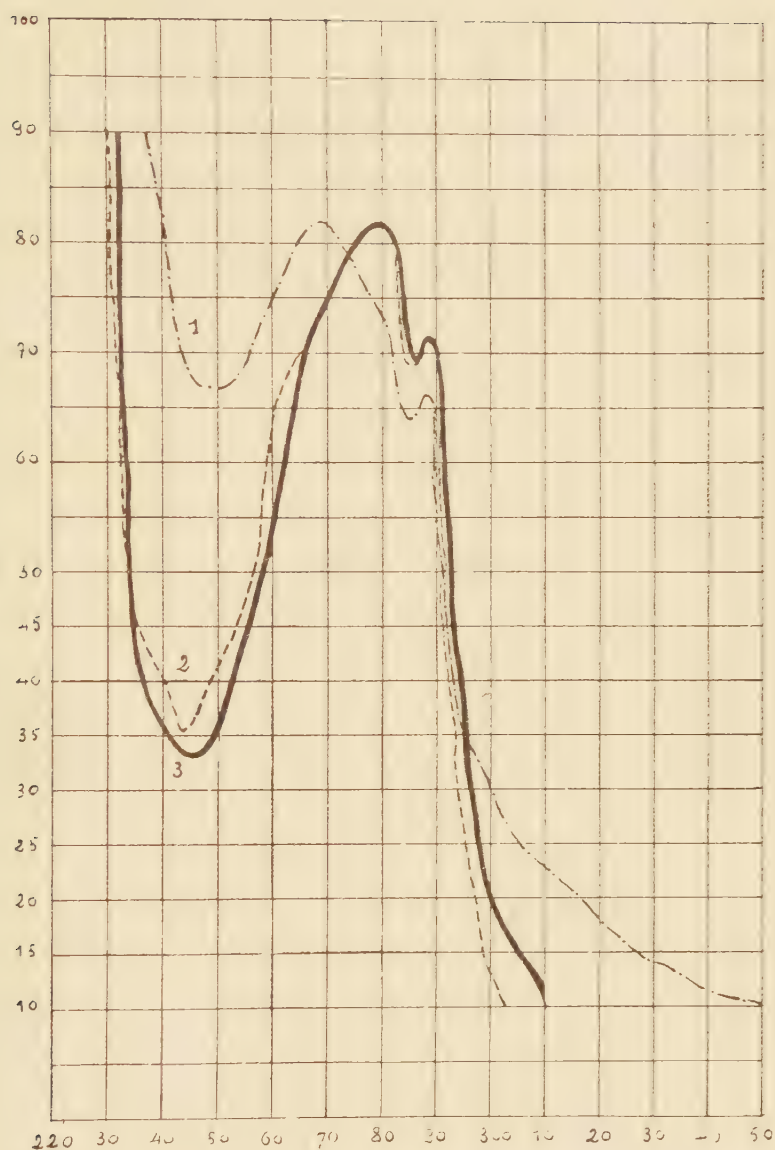


FIG. 13

Tryptamine à 0,030 0/00.

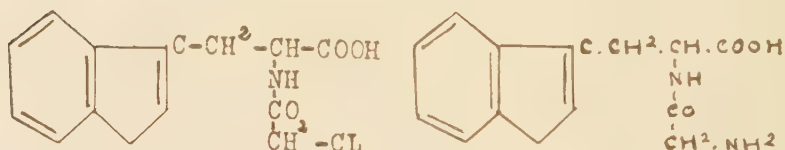
- 1) Irradiée 15 minutes à pH 11.
- 2) Irradiée 15 minutes à pH 4,4.
- 3) Non irradié à pH 11.

tion à la molécule, par contre, en milieu alcalin à pH 11, la destruction est bien plus prononcée. On retrouve la bande étroite, mais le produit d'oxydation confère à l'ensemble un coefficient d'absorption beaucoup plus accusé.

L'influence du groupement  $\text{NH}^2$  est donc très marquée dans la fragilité de la molécule de l'acide aminé.

### GLYCYL $\alpha$ -TRYPTOPHANE

Il nous a paru intéressant, pour fixer le rôle du groupement  $\text{NH}^2$  dans la sensibilité à la photolyse des acides aminés, d'examiner parallèlement l'effet des rayons sur le glycyl  $\alpha$ -tryptophane et la chloracétyl  $\alpha$ -tryptophane.



Ici, le groupement aminé se trouve placé au bout de la chaîne aliphatique. Le groupement aminé de la chaîne amino-propionique se trouve bloqué, comme précédemment, dans le chloracétyl  $\alpha$ -tryptophane.

Les spectres du glycyl  $\alpha$ -tryptophane en milieu acide et en milieu alcalin sont presque exactement superposables. Ils rappellent l'un et l'autre le spectre du tryptophane avec, cependant, à concentration égale, un pouvoir absorbant moins prononcé, la molécule de la glycine alourdissant le poids moléculaire sans en augmenter la puissance d'absorption.

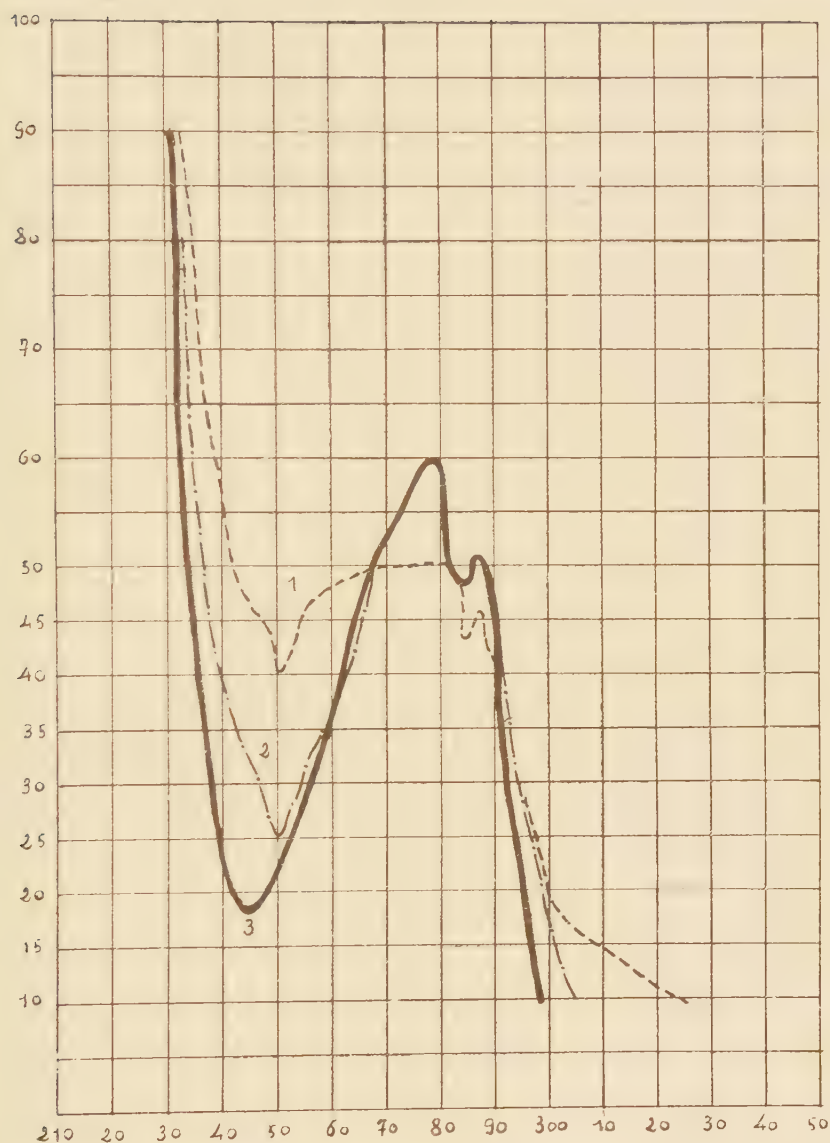


FIG. 14

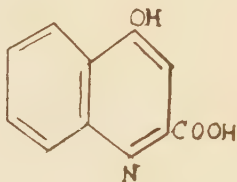
Glycyl- $\alpha$ -tryptophane à 0,030 g/100.

- 1) Irradié 15 minutes à pH 11.
- 2) Irradié 15 minutes à 4,4.
- 3) Non irradié à pH 11.

Les effets de l'irradiation sont d'un fait beaucoup plus accusés en milieu alcalin qu'en milieu acide. Dans ce dernier cas, les modifications sont à peine visibles. Au contraire, en milieu alcalin à pH 11 la courbe est complètement altérée. Si l'on perçoit même la bande étroite vers  $\lambda$  288, par contre la bande habituelle vers  $\lambda$  280 cède la place à un large plateau s'étendant jusqu'à  $\lambda$  260, accusant ainsi une destruction moléculaire profonde, beaucoup plus accusée que dans le cas du chloracétyl-tryptophane où les fonctions  $\text{NH}^2$  se trouvent bloquées, et où aucune autre n'est libre.

### ACIDE CYNURENIQUE

Il nous a paru intéressant, pour compléter cet exposé de l'influence des rayons ultra-violet sur le tryptophane et ses dérivés, d'étudier le spectre de l'acide cynurénique.



On sait que ce dernier constitue une des étapes de la destruction catabolique de la molécule de l'acide indol-amino-propionique, et que chez certaines espèces animales, une grande partie du tryptophane est éliminé par les urines. La molécule de

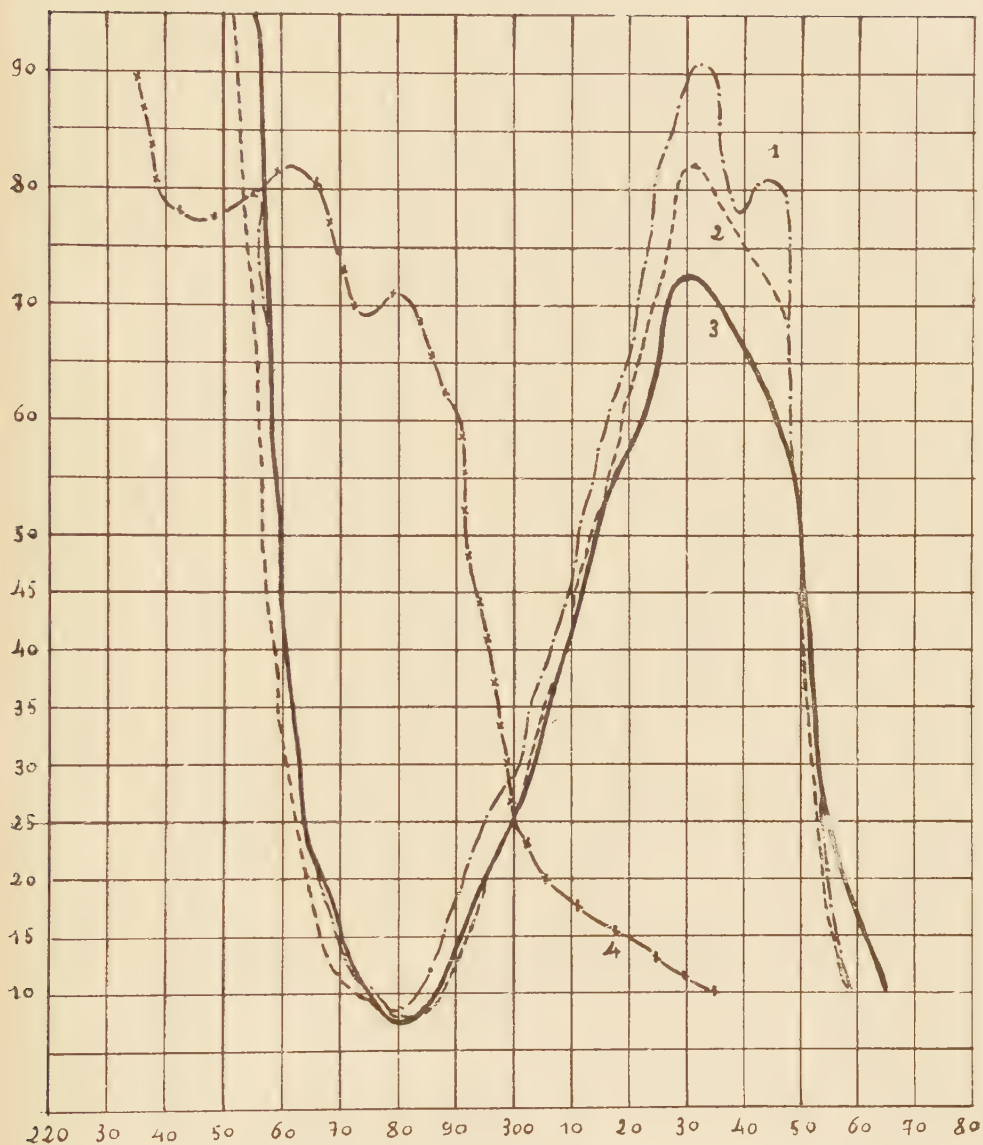


FIG. 15

Acide kynurénique à 0,015 0/00.

- 1) Irradié 15 minutes à pH 4,4.
- 2) Non irradié à pH 4,4.
- 3) Non irradié à pH 11.
- 4) Irradié 15 minutes à pH 11.

l'indol a ici complètement disparue pour céder la place à un noyau de l'oxyquinoléine.

La coexistence de deux noyaux cycliques, le grand nombre de doubles liaisons confèrent à la molécule un pouvoir absorbant bien plus considérable que la molécule de l'indol ou du tryptophane. La courbe est caractérisée par la présence de deux larges bandes, aussi bien en milieu alcalin qu'en milieu acide, l'une à  $\lambda$  340-325, l'autre à  $\lambda$  290-270. Cependant l'absorption en milieu alcalin est moins prononcée qu'en milieu acide. Par contre, l'influence de l'irradiation est totalement différente suivant le pH du milieu sur lequel elle agit. Tandis que, en milieu acide il n'y a qu'une modification insignifiante, en milieu alcalin la destruction est extrêmement prononcée, et on ne reconnaît absolument plus la courbe initiale de l'acide 4 oxyquinoléine 2 carbonique. Il est probable que c'est la présence du groupement phénolique qui confère à la molécule cette sensibilité particulière à l'irradiation. Nous allons du reste la retrouver dans l'étude de la tyrosine.

Nous établissons ci-dessous 2 tableaux (fig. 16 et 17) comparatifs de courbes. On peut y voir nettement ceci : l'action des rayons ultra-violets varie selon le milieu acide ou alcalin.

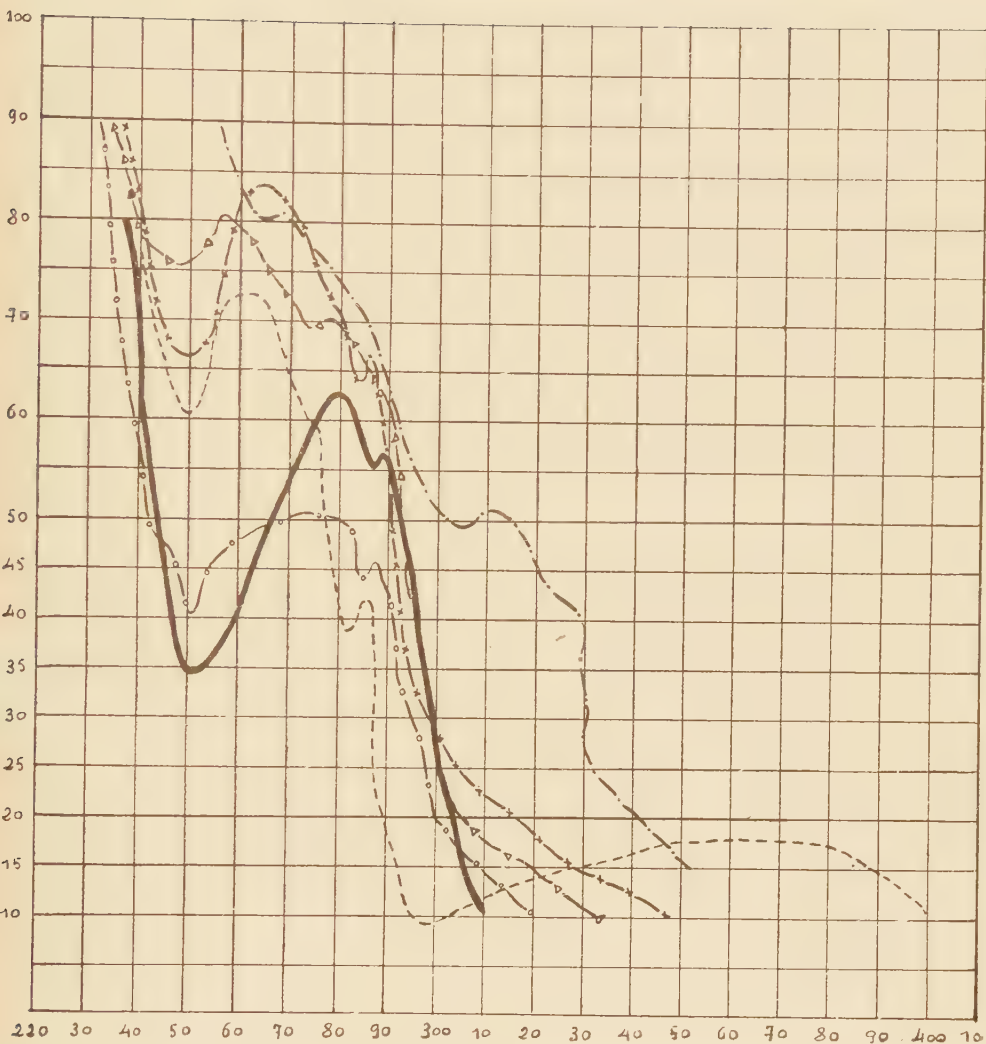


FIG. 16

Après irradiation de 15 minutes au milieu alcalin

Tryptophane — — — —  
 Tryptamine — x — x —  
 Acide cynurénique — Δ — Δ —  
 Indol — — — —  
 Glycyl-α-tryptophane — o — o —  
 Chloracétyl-α-tryptophane — — — —

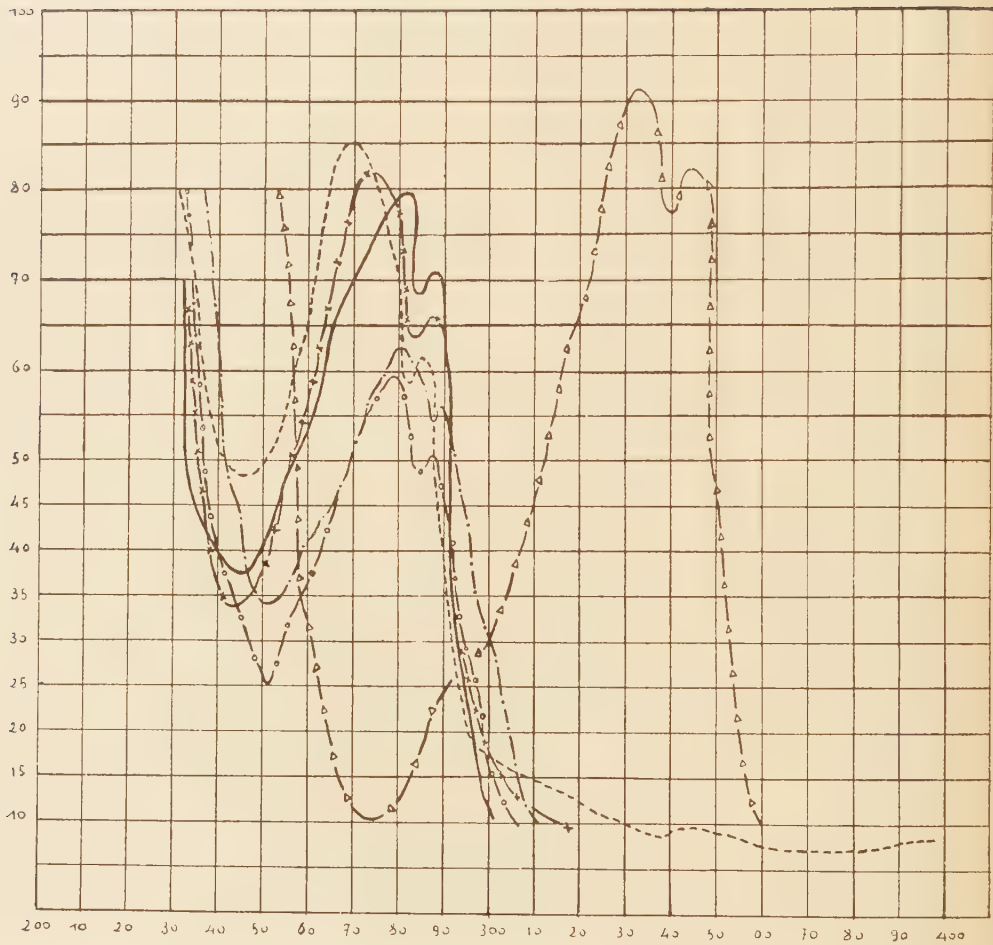


FIG. 17

Après une irradiation de 15 minutes au milieu acide.

Tryptophane —x—x—  
Tryptamine —+—+—  
Acide cynurénique —Δ—Δ—  
Indol — — —  
Glycyl- $\alpha$ -tryptophane —o—o—  
Chloracétyl- $\alpha$ -tryptophane —. —. —

B. -- Etude de la tyrosine.

ACIDE PARA-OXYPHENYL  $\alpha$  AMINO-  
PROPIONIQUE

TYROSINE



Le spectre la tyrosine a été étudié par nombre d'auteurs (V. Henri, Dhéré, Castille et Ruppoll). Tout récemment, Holiday a publié deux courbes prises l'une en solution de la soude N/10, l'autre dans l'acide chlorhydrique N/10. Ces deux courbes diffèrent nettement. Il nous a paru intéressant, en tout premier lieu, de nous rendre compte comment se produisait la modification de l'allure générale de la courbe et à quel pH elle avait lieu.

Nous avons donc préparé toute une série de solutions à concentration égale, dont le pH a été soigneusement contrôlé à l'électrode d'hydrogène, et respectivement acidifiées ou alcalinisées par des doses croissantes d'acide chlorhydrique ou de soude.

On sait que la tyrosine présente trois 3 pK, qui sont respectivement :

| COOH pK | NH <sup>2</sup> pK | OH pK |
|---------|--------------------|-------|
| 2,35    | 9,16               | 10,41 |

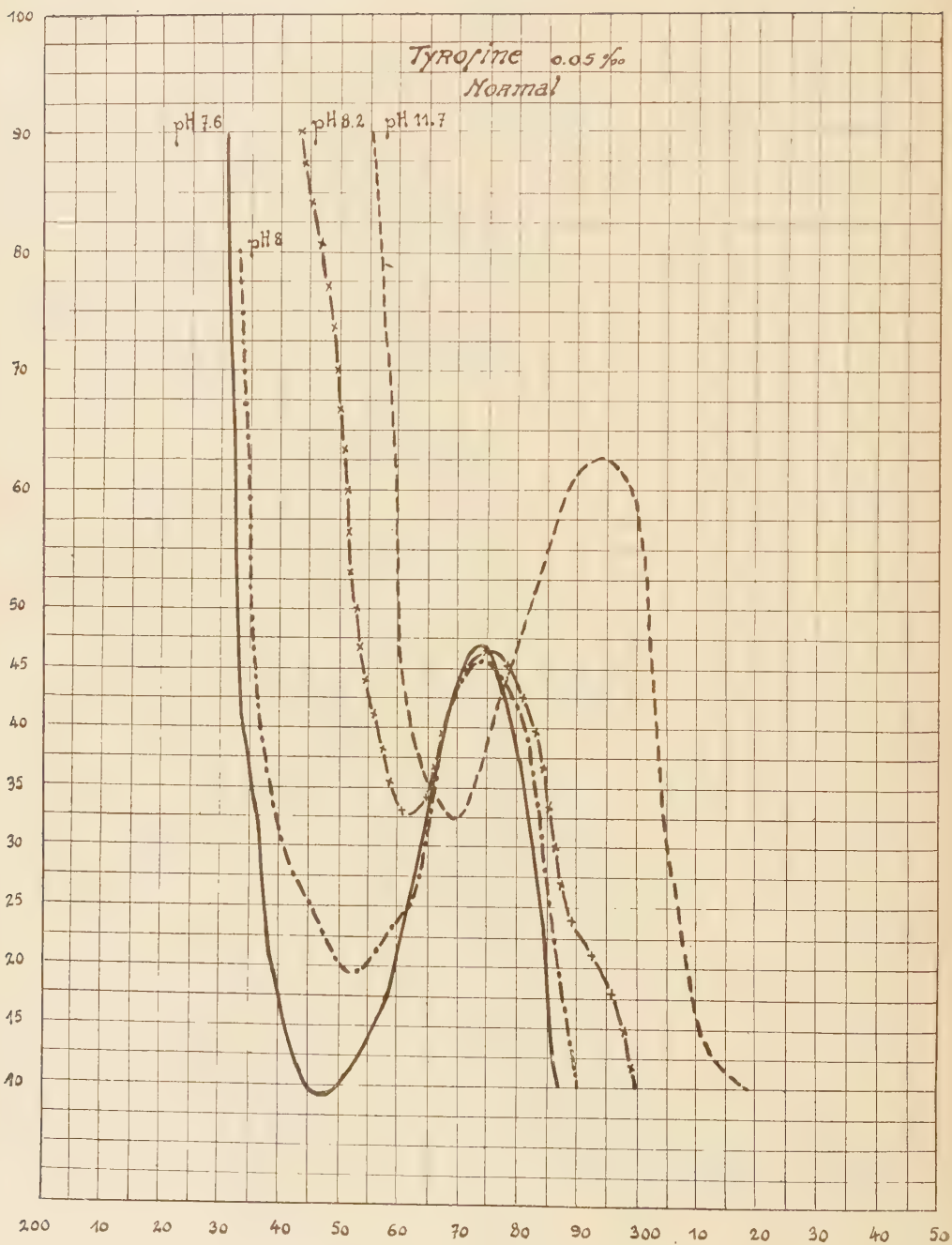


FIG. 18

Tyrosine à 0,05 0/00. — Normal.

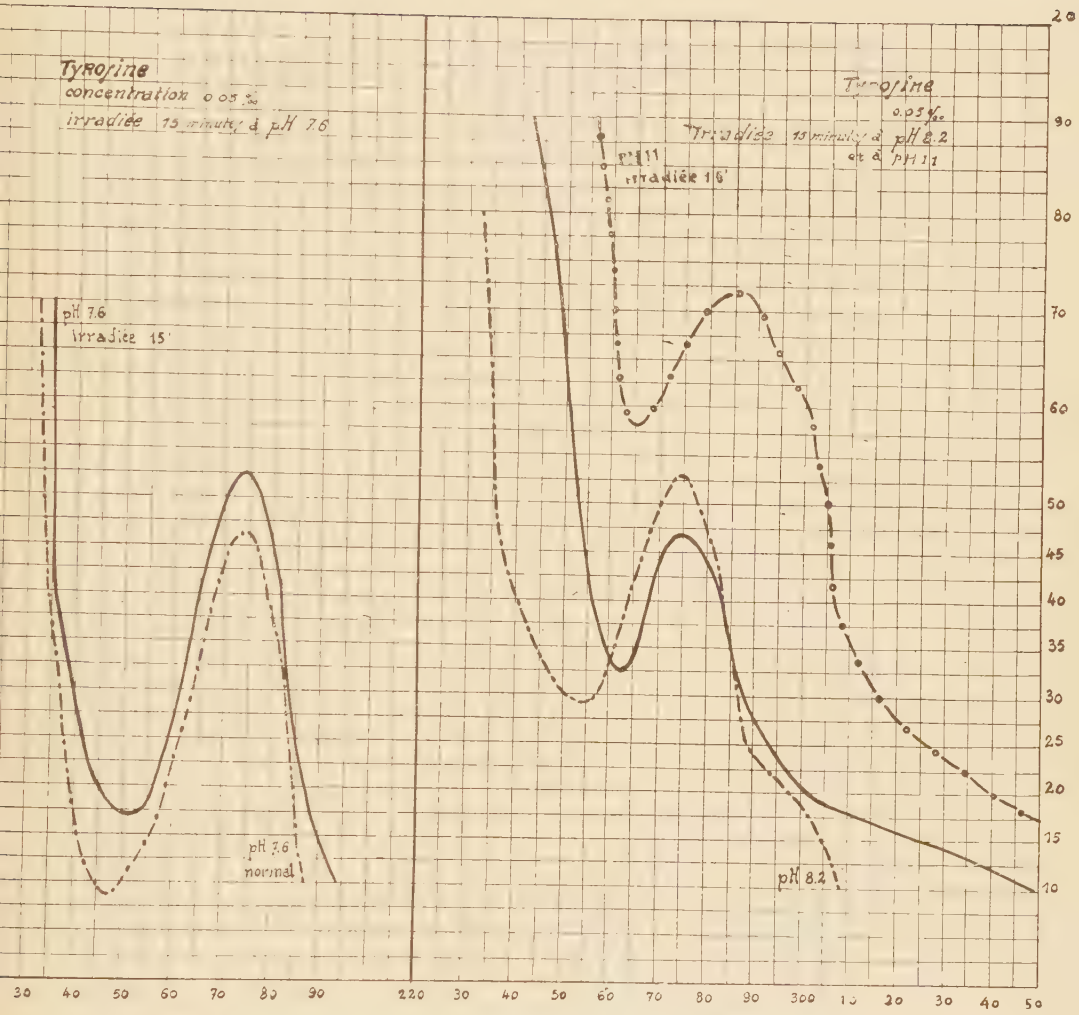


FIG. 19

FIG. 20

FIG. 19

Tyrosine , 0,05 0/00. — Irradiée 15 minutes à pH 7,6.

FIG. 20

Tyrosine à 0,05 0/00. — Irradiée 15 minutes à pH 8,2 et à pH 11.

Comme on peut s'en rendre compte par l'allure générale des graphiques ci-joints, les modifications de la courbe en fonction du pH n'ont aucune corrélation avec les pK, ci-dessus.

En milieu acide le spectre de la tyrosine comporte deux bandes : l'une vers  $\lambda$  275, l'autre à  $\lambda$  247.

Comme le fait remarquer Castille, il présente les caractères de celui du phénol. Le maximum d'absorption se trouve à Col. I/I° 45 à  $\lambda$  273, le minimum à Col. I/I° 9 à  $\lambda$  247.

Au fur et à mesure que s'élève le pH, le minimum d'absorption se déplace vers les grandes longueurs d'ondes, en même temps qu'augmente le coefficient d'absorption, à pH 8,  $\lambda$  250 et Col. I/I° 20, à pH 8,5  $\lambda$  262 et Col. I/I° 32,5. Cependant le sommet de la première bande reste inchangé à Col. I/I° 47 à  $\lambda$  270.

A pH 10,5 l'aspect général de la courbe se modifie. Le coefficient d'absorption est beaucoup plus considérable et le sommet de la première bande s'élève à Col. I/I° 62,5 pour  $\lambda$  295.

Deux faits sont ici à mettre en évidence :

a) Tandis que la solution alcaline de tryptophane est moins absorbante que la solution acide, c'est le contraire qui se rencontre dans la solution alcaline de tyrosine ;

b) De plus, il est frappant de voir le changement de la courbe se produire à pH 10,5, c'est-à-dire au niveau du pH de la fonction phénol de l'acide ; les effets de l'irradiation ne sont pas moins influencés par le pH de la solution.

Nous avons irradié pendant 15 minutes et dans les

mêmes conditions trois échantillons de tyrosine, respectivement à : pH 7,6 pH 8,2, et pH 11. On voit de suite la différence d'allure.

Tandis que, dans les deux premiers échantillons, les modifications structurales semblent peu marquées, à peine accusées par une légère augmentation de l'absorption, au contraire à pH 11, la dislocation moléculaire est beaucoup plus avancée. La courbe perd son caractère, les bandes s'effacent et sont moins accusées.



## CONCLUSIONS

I. — Depuis les travaux de Dhéré, V. Henri, Vlès, il est démontré que la courbe spectrographique des protéines est liée à la présence dans la molécule de ces dernières des acides aminés cycliques : tryptophane, tyrosine, phényl-alanine, etc...

II. — L'effet de « photolyse » par les rayons ultra-violets, si elle a été observée depuis longtemps, ne semble pas avoir été systématiquement étudié sauf en ce qui concerne les polyholosides et les hétérosides.

III. — Les travaux de Spiegel Adolf ont cependant démontré que l'aspect du spectre du sérum était modifié après exposition aux radiations ultra-violettes.

IV. — Nous avons étudié systématiquement l'effet des radiations ultra-violettes sur le tryptophane, en étudiant successivement les différents éléments moléculaires : indol, acide indol propionique, acide indol amino-propionique, acide glycy-indol-amino-propionique, acide chloracétyl indol amino-propionique.

V. — Nous avons démontré que :

a) Le pH du milieu intervenait d'une façon considérable dans l'intensité de l'attaque par les rayons ultra-violet ;

b) Le groupement aminé conférait à la molécule du tryptophane une grande sensibilité aux rayons ultra-violet ;

c) Le spectre de la tyrosine était aussi très influencé par l'action des rayons, et que cette sensibilité dépendait du pH du milieu.

Vu : *Le Doyen,*  
JEAN LÉPINE.

*Le Président de la Thèse,*  
G. FLORENCE.

*Vu et permis d'imprimer :*

Lyon, le 10 Juin 1938.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ.  
A. LIRONDELLE.

## BIBLIOGRAPHIE

- HAUSMANN (W.). — Über die photodynamische Wirkung chlorophyllhaltiger Pflanzenextrakte. *Biochem. Zeitschrift*, t. 12, p. 331, 1908.
- Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. *Biochem. Zeitschrift*, t. 30, p. 276, 1911.
- FÜRTZ und FISCHER. — Über die Ermittlung des Tyrosingehalts von Proteinen. *Biochem. Zeitschrift*, t. 154, p. 1, 1924.
- FÜRTZ und DISCHE. — Kritisches und experimentelles über die Tryptophanbestimmung in Proteinen. *Biochem. Zeitschrift*, t. 146, p. 275, 1924.
- SPIEGEL (Adolf). — Hitzeveränderungen des Albumins. *Biochem. Zeitschrift*, t. 170, p. 126, 1927.
- Neue Beiträge zur Frage der Eiweissdenaturierung. *Biochem. Zeitschrift*, t. 204, p. 1, 1929.
- RAO. — Photolyse des acides aminés par la lumière solaire. *J. indust. Chem. Soc.*, t. 11, p. 617, 1934.
- GUILLAUME et TANRET — Sur l'hydrolyse des glucosides et de quelques composés organiques par les rayons ultra-violets. *Bull. Soc. Chem. Biol.*, t. 18, p. 556-572, 1936.
- KIESEL und KUSMIN. — Über chemische Vorgänge bei der Hitzedenaturierung von Eiveiss. *Zeitschrift. physiol. chem.*, t. 238, p. 145-148, 1936.
- ABDERHALDEN und ROSSNER. — Weitere Studien über die Lichtabsorption in Ultra-violette durch  $\alpha$ -Aminosäuren, Polypeptide, 2,5-Dioxopiperazine und Betaine. *Hoppe-Seyl. Z.*, t. 178, p. 156, 1929.

- ABDERHALDEN und HAAS. — Spectrophotometrische Untersuchungen von aromatischen Aminosäuren und von Derivaten von solchen. *Hoppe-Seyl. Z.*, t. 166, p. 78, 1927.
- ABDERHALDEN und ROSSNER. — Vergleichende Untersuchungen über die Lichtabsorption Ultra-violette durch  $\alpha$ -Aminosäuren. *Hoppe-Seyl. Z.*, t. 176, p. 249, 1928.
- HOLIDAY. — Spectrophotometry of proteins. 1° Absorption of tyrosine; tryptophan and their mixtures ; 2° Estimation of tyrosine and tryptophan in proteins. *Bioch. J.*, 30, p. 1795. 1936, 2.
- TWYMAN & ALLSOPP. — Spectrophotometry. (London), 1934.
- WEIGERT. — Optischen Methoden in Chemie. (Leipzig), 1927.
- MORROW. — Biochemical Laboratory methods. (New-York), 1927.
- VOLMAR. — La photolyse et la loi de l'équivalence photochimique. *Arch. Phys. biolog.*, t. 3, n° 4, 1924.
- BIERRY, VICTOR HENRI et RANC (A.). — Actions des rayons ultra-violets sur la saccharose. *C. R. Acad. Sciences*, t. 152, p. 1629, 1913.
- BERTHELOT (Daniel) et GAUDECHON (H.). — Photolyse des diverses catégories de sucres par la lumière ultra-violette. *C. R. Acad. Sciences*, t. 155, p. 1153-156, 1912.
- Sur l'inversion du saccharose par les rayons ultra-violets. *C. R. Acad. Sciences*, t. 156. p. 468, 1913.
- STENSTROM et REINHARD. — Ultra violet absorption spectra of blood serum and certain amino-acide. *J. Biol. Chem.*, t. 66, p. 819, 1925.
- WARD. — The absorption spectra of some amino-acids. *Biochem. J.*, t. 17, p. 8, 1923.

- VAN SLYKE et BAKER. — The preparation of pure casein. *J. Biol. Chem.*, t. 35, p. 127, 1918.
- JENSEN et WINTERSETEINER. — The hydrolysis products of insulin. *J. Biol. Chem.*, t. 98, p. 281, 1932.
- FOLIN CIOCALTEAU. — On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, t. 73, p. 627, 1927.
- HEWITT. — Optical rotatory power and dispersion of proteins. *Biochem. J.*, t. 21, p. 216, 1927, I.
- HOLIDAY. — The characteristic absorption of ultra violet radiation by certain purines. *Biochem J.*, t. 24, p. 619, 1930, I.
- DREYER (Georges) et HANSEN (Olav). — Coagulation observée sous l'influence des rayons ultra-violet sur différentes albumines. *C. R. Acad. Sciences* [145], p. 234, 1907.
- HARRIS (D.-Th.). — Observation on the velocity of the photo-oxidation of proteins and amino acids. *Bioch. Journal* [20], p. 268, 1926.
- DHÉRÉ. — Recherches spectrographiques sur l'absorption des rayons U. V. par les albuminoïdes, protéïdes et leurs dérivées. (Paris, 1909).
- ECKSTEIN (H.) et LIEBEN (F.). — Sur la rupture des liaisons de l'azote dans les protéïdes et des peptides irradiés par la lumière de la lampe de quartz. *Bioch. Zcit.*, t. 263, p. 366-370, 1933.
- LOISELEUR (J.). — Sur le mode d'action des corps radioactifs sur les protéïdes. *C. R.*, t. 201, p. 54, 1935.
- Action du radon sur les acides aminés. *C. R. Soc. de Biol.*, t. 114, p. 589, 1933.
- PONTHUS (P.). — Action d'un rayon U. V. sur les dissolutions aqueuses de gélatine. Modifications de quelques caractères physico-chimiques. Photolyse probable. *C. R.*, t. 196, p. 1248, 1933.

- VLÈS (F.) et GEX. — Sur les modifications spectrales des corps organiques du pH et sur la représentation mathématique des fonctions qui relient les rapports d'absorption au pH. *Arch. de Phys. Bolog.*, t. 4, 1927-1928.
- VLÈS (F.) et HEINTZ. — Spectre infra-rouge des substances protéiques. *C. R.*, t. 200, p. 1927, 1935.
- Sur l'interprétation du spectre infra-rouge des protéines. *C. R.*, t. 204, p. 567, 1937.
- LIEBEN (F.) und JESSERER (H.). — Zur Frage der Einwirkung ultraviolette Strahlen auf Pepton- und Proteinlösungen. *Biochem. Zeitschrift*, t. 275, p. 367, 1935.
- GROH (J.) und WELTNER (M.). — Über die chemischen und spektroskopischen Eigenschaften des Serumglobulins. *Biochem. Zeitschrift*, t. 273, p. 389, 1934.
- ARNOLD et KISTIAKOWSKY. — Absorption spectra in solution at two temperatures. *J. Amer. Soc.*, t. 54, p. 1713, 1932.
- SPIEGEL (Adolf). — Effect of ultra violet radiation and heat upon protein solutions of low concentrations. *Biochem. J.*, t. 28, p. 372-379, 1934.
- BIERRY (H.) et HENRI (V.). — Actions des rayons ultraviolets sur certains hydrates de carbone. *C. R. Soc. Biol.*, 14 mai 1910, p. 821.
- NEUBERGER. — Electrometric titration of Amino-acids in aqueous alcoholic solution. *Proc. Roy. Soc.* [B 115], p. 180, 1934.
- VON HALBAN et EISENBAND. — Of the measurements of high absorption. *Proc. Roy. Soc.* [A. 116], p. 153, 1927.
- GUTHMANN, SCHWERIN et STAHLER. — Die Ultraviolettaborption der Eiweissbaustoffe. *Strahlentherapie*, t. 39, p. 401, 1931.

- LIEBEN (Fretz). — Über die Zerstörung einiger Aminosäuren durch Belichtung. *Biochim. Leitsch* [184], p. 453, 1927.
- SORET. — Recherches sur l'absorption. *Arch. Sc. Phys. et Naturelles.*, t. 10, p. 429-495, 1883.
- HEYMANN (E.). — Dilatometric investigations on the heat-denaturation of proteins. *Biochem. J.*, t. 30, p. 127, 1936, I.

## TABLE DES MATIERES

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Avant-propos . . . . .                                                   | 11 |
| Introduction . . . . .                                                   | 13 |
| Description du spectrographe . . . . .                                   | 17 |
| Technique détaillée d'une opération pratique . . . . .                   | 31 |
| Préparation des solutions . . . . .                                      | 37 |
| Etude spectrographique de l'indol . . . . .                              | 38 |
| Acide indol-3-propionique . . . . .                                      | 42 |
| Acide $\beta$ -indol $\alpha$ -amino propionique (tryptophane) . . . . . | 44 |
| Chloracétyl $\alpha$ -tryptophane . . . . .                              | 48 |
| Tryptamine . . . . .                                                     | 50 |
| Glycyl $\alpha$ -tryptophane . . . . .                                   | 52 |
| Acide cynurénique . . . . .                                              | 54 |
| Acide para-oxyphényl $\alpha$ -amino-propionique (tyrosine) . . . . .    | 59 |
| Conclusions . . . . .                                                    | 65 |
| Bibliographie . . . . .                                                  | 67 |



